

**PHÄNOTYP UND FUNKTION VON
MONOZYTEN BEI INFEKTIONEN MIT DEM
HUMANEN IMMUNDEFIZIENZ VIRUS**

JÜRGEN HAAS

~~1987~~

Disbui, München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Immunologischen Institut der Universität München
Vorstand Prof. Dr. Gert Riethmüller

Phänotyp und Funktion von Monozyten
bei Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz Virus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jürgen Haas
aus
Sindelfingen
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Riethmüller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. F. Deinhardt Prof. Dr. A. Baethmann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. H.W.L. Ziegler-Heitbrock
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	3.3.1988

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen.....	3
1. Einleitung.....	4
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Patienten.....	9
2.2 Separation von PBM.....	10
2.3 Herstellung von hitzeaggregiertem humanen IgG...11	
2.4 Monoklonale Antikörper.....	13
2.5 Immunfluoreszenz.....	16
2.6 Flowzytometrische Analyse.....	17
2.7 Herstellung von adhärenenten Zellen.....	20
2.8 Mitogenstimulation.....	20
2.9 Herstellung und Kontrolle pyrogenfreier Materialien.....	21
2.10 Ermittlung der α TNF-Produktion.....	22
2.11 Statistische Analyse.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Immunologische Charakterisierung der Patienten..25	
3.2 Untersuchung der Oberflächenantigene auf Monozyten.....	30
3.2.1 Kontrolle der unspezifischen Bindung.....	30
3.2.2 Charaktersisierung von LeuM3 ⁺ Zellen.....	34
3.2.3 Einfluss der Fixierung auf die Immunfluoreszenz.....	36
3.3 Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten von Patienten mit HIV-Infektion.....	38
3.3.1 Expression auf frischen Monozyten.....	38
3.3.2 Expression auf adhärenenten Zellen.....	46
3.4 Untersuchung der α TNF-Produktion von Monozyten...48	
3.4.1 In-vitro Stimulation von Monozyten mit LPS.....	48

3.4.2	Zellfreier Test.....	50
3.5	TNF-Produktion bei Patienten mit HIV-Infektion.....	52
3.5.1	Neutralisationsexperimente mit MAB gegen α TNF...	55
4.	Diskussion.....	57
5.	Zusammenfassung.....	69
	Literaturverzeichnis.....	71
	Danksagung.....	79
	Lebenslauf.....	80

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Act.D	Actinomycin D
aggIgG	Hitzeaggregiertes humanes IgG
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARC	AIDS related complex
CD4/CD8-Ratio	Quotient aus der Anzahl der CD4 ⁺ Lymphozyten und der Anzahl der CD8 ⁺ Lymphozyten
cha	Kanal
ConA	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
E:T-Ratio	Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPH	Hämophilie
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin des Isotyps G
Il2	Interleukin 2
Kd	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAB	Monoklonaler Antikörper
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
M.w.	Molekulargewicht
n.d.	nicht durchgeführt
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBM	Periphere polymorphnukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
rpm	Umdrehungen pro Minute
TFR	Transferrin
TNF	Tumornekrose Faktor

1. Einleitung

AIDS ist klinisch charakterisiert durch eine schwere Immundefizienz und konsekutive opportunistische Infektionen und/oder Malignome. Unter den opportunistischen Infektionen dominieren Pneumonien mit *Pneumocystis carinii pneumoniae*, Meningo-encephalitiden mit *Cryptococcus neoformans* und *Toxoplasma gondii*, Infektionen des Magen-Darm-Trakts mit *Cryptosporidium diarrhea* und des Ösophagus mit *Candida*, sowie disseminierte Infektionen mit Cytomegalie-Virus und *Mycobacterium avium intracellulare* (18,29,61,73,81,88). Die auftretenden Malignome sind vorwiegend Kaposi Sarkome und Non-Hodgkin-Lymphome (21,59).

Die immunologischen Alterationen bei einer Infektion mit HIV sind vielfältig und betreffen sowohl T-Lymphozyten (2,46,50,66,70) als auch B-Lymphozyten (3,41) und NK-Zellen (67,73). Die wahrscheinlich wichtigste Veränderung des Immunsystems ist die kontinuierliche Abnahme der $CD4^+$ Helferzellen, die auch für einige Veränderungen der anderen Zellsubpopulationen als Ursache angenommen wird, da $CD4^+$ Helferzellen wichtige immun-regulatorische Aufgaben besitzen und auf vielfältige Weise, z.B. über IL 2 und andere Mediatormoleküle, mit diesen interagieren. McDougal et al. (47) konnten zeigen, dass das HIV Glykoprotein gp 110 an das $CD4$ Molekül bindet. Ausserdem wiesen Dagleish et al. (15) nach, dass die Bindung von HIV an die Zelloberfläche von $CD4^+$ Zellen durch MAB gegen $CD4$ inhibiert werden kann und Klatzman et al. (38) schliesslich gelang es, die in vitro

Replikation von HIV in CD4⁺ Lymphozyten durch Inkubation mit MAB gegen CD4 zu verhindern. Aufgrund dieser Daten wurde das CD4 Molekül als der putative Virusrezeptor für die Inokulation von HIV in CD4⁺ Lymphozyten angenommen und konsequenterweise standen T-Lymphozyten lange Zeit im Mittelpunkt der Erforschung der Auswirkungen der HIV-Infektion auf das humane Immunsystem.

Andererseits ist CD4 auch auf Monozyten des peripheren Blutes (51,87) und Makrophagen (25,87) exprimiert, wenngleich die Anzahl der exprimierten CD4 Moleküle pro Zelle auf diesen Zellen wesentlich niedriger ist als bei T-Helferzellen. Da dies erst 1983 von Moscicki et al. (51) und Wood et al. (87) publiziert wurde, blieben die Untersuchungen von Monozyten im Zusammenhang mit AIDS lange Zeit im Hintergrund, nicht zuletzt auch deswegen, weil man im Blut von Patienten mit AIDS zwar eine ausgeprägte Lymphopenie und vor allem eine Reduktion von CD4⁺ Helferzellen findet, die Anzahl der peripheren Blutmonozyten jedoch kaum beeinträchtigt zu sein scheint. Die ersten Untersuchungen von Monozyten bei AIDS schliesslich brachten Ergebnisse, die schwer interpretierbar waren. Zum einen zeigte sich ein Defekt in der Fc-Rezeptor vermittelten Phagozytose (58) und in der Chemotaxis (74), sowie eine reduzierte Expression von MHC class II Antigenen auf kultivierten Monozyten (33), auf der anderen Seite war die Zytotoxizität von Monozyten gegenüber der Tumorzelllinie A375 (39) und die Lyse der intrazellulären Erreger Toxoplasma gondii und Chlamydia psittaci in Alveolarmakrophagen, die ebenfalls der Monozyten/Makrophagen Linie zugerechnet werden, bei Patienten mit AIDS unverändert (52). Monozyten scheinen also in der Pathogenese

der HIV-Infektion mit involviert zu sein, wenngleich offensichtlich nur einzelne Funktionen beeinträchtigt zu sein scheinen. Schliesslich konnte von Ho et al. (35) nachgewiesen werden, dass Monozyten in vitro von HIV infiziert werden können und offensichtlich auch in vivo von HIV infiziert sind, was kurze Zeit später von Gartner et al. (22) bestätigt wurde. Diese Untersuchungen bewirkten, dass Monozyten mehr und mehr eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der HIV-Infektion zugeschrieben wird. Möglicherweise sind Monozyten/Makrophagen als Zellen mit relativ langer Lebensdauer bei der Persistenz des Virus im menschlichen Körper beteiligt ähnlich wie bei Visna Viren (23,54), mit denen HIV eng verwandt ist (26,75). Diskutiert wird inzwischen auch, ob HIV mittels latent infizierter Monozyten als Trägerzellen in der Lage ist, die normalerweise inpermeable Blut-Hirnschranke zu durchdringen (22,69) und dort die Enzephalopathie auslöst, deren Pathogenese bislang ungeklärt ist (19,72). Unter Umständen sind Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie sogar primäres Ziel der HIV-Infektion und werden von diesen Zellen dann im Zuge ihrer Funktion als antigenpräsentierenden Zellen auf CD4⁺ Helferzellen übertragen (69).

Zusammenfassend lässt sich also konstatieren, dass die bisher publizierten Daten über Monozyten bei AIDS zum Teil widersprüchlich sind und die Rolle von Monozyten in der Pathogenese von AIDS noch weitgehend ungeklärt ist. In diesem Zusammenhang nun war es natürlich von besonderem Interesse zu erfahren, inwiefern Monozyten im peripheren Blut von Patienten mit AIDS eine Veränderung der Antigene auf der Zelloberfläche zeigen. In

den durchgeführten Untersuchungen wurde die Expression von CD4 untersucht, da dieses Molekül in der Pathogenese der HIV-Infektion offensichtlich eine wichtige Rolle spielt und sowohl die Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten als auch die Menge der exprimierten CD4 Moleküle auf den verbleibenden CD4⁺ Lymphozyten stark abnimmt. Die Genprodukte der HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR Subloci spielen als MHC class II Antigene in der Funktion der Monozyten als antigenpräsentierenden oder akzessorischen Zellen eine wichtige Rolle. Ausserdem wurden der C3bi-Rezeptor, der Fc-Rezeptor und der Rezeptor für Transferrin als funktionell wichtige Moleküle der Monozytenoberfläche in die Untersuchungen mit aufgenommen. Diese Antigene wurden mit Hilfe einer DoppelmarkerImmunfluoreszenz bestimmt, bei der die Monozyten mittels eines mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FITC direkt gekoppelten Antikörpers identifiziert wurden. Gleichzeitig wurde jeweils ein zweites Antigen mittels eines biotinylierten Antikörpers analysiert, an den der gelbe Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gebunden wurde. Auf diese Weise wurde die Analyse von Antigenen auf einer bestimmten Zellsubpopulation ohne vorherige Aufreinigung dieser Subpopulation möglich.

Um zusätzliche Daten über die Funktionsfähigkeit von Monozyten bei AIDS zu bekommen und damit die Rolle von Monozyten in der Pathogenese der HIV-Infektion weiter aufzuklären wurde in der vorliegenden Arbeit ausserdem eine Funktion untersucht, die unter Umständen einen wichtigen Parameter bei der Tumorgenese in AIDS darstellt und die möglicherweise Hinweise in der Frage geben könnte, weshalb es bei einigen Patienten mit AIDS zur Ausbildung

eines Kaposi Sarkoms kommt, wohingegen die häufigste Manifestationsform von AIDS opportunistische Infektionen sind. Die Fähigkeit von Monozyten zur Produktion von Tumor necrosis factor (TNF) wurde mittels eines ^{51}Cr -Release-Tests mit WEHI 164 Maus-Fibrosarkomzellen als Targetzellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Neunzehn Patienten mit Symptomen für AIDS nach der Definition des Center of Disease Control (10,11,12) wurden untersucht. Von diesen zeigten neun Patienten Infektionen mit *Pneumocystis carinii pneumoniae* und andere opportunistische Infektionen, neun Patienten ein Kaposi Sarkom, welches durch Biopsie gesichert worden war, und eine Patient sowohl ein Kaposi Sarkom als auch eine Infektion mit *Pneumocystis carinii*. Alle Patienten mit AIDS waren HIV seropositiv und gehörten Risikogruppen an. Die Gruppe der Patienten mit ARC bestand aus zehn HIV seropositiven Patienten, von denen sechs der Risikogruppe der Homosexuellen angehörten und die eine persistierende Lymphadenopathie, Nachtschweiss und Gewichtsabnahme zeigten, sowie vier Hämophile mit muko-kutanen Effloreszenzen wie Herpes simplex generalisatus und Soorösophagitis. Weiterhin wurden acht HIV seropositive Hämophile ohne klinische Symptomatik untersucht. Die Blutproben dieser Patienten wurden entweder aus der Medizinischen Universitätsklinik München, Abt. Hämostaseologie (Dr. Schramm), dem Krankenhaus Schwabing, Innere Abteilung (Dr. Jäger), der Dermatologischen Universitätsklinik München (Dr. Fröschl) oder der Medizinischen Poliklinik München bezogen. Die HIV Serologie wurde von Dr. L. Gürtler, Pettenkofer Institut München, mittels ELISA und Western Blot durchgeführt. Als Kontrollen wurden in den durchgeführten Experimenten PBM von sechzehn männlichen hetero-

sexuellen Personen vergleichbaren Alters verwendet. Ausserdem wurden als Kontrollen für die seropositiven Hämophilen die Zellen von acht seronegativen Hämophilen ohne klinische Symptomatik verwendet.

2.2 Separation von PBM

Den Patienten wurden 40 ml Blut in heparinisierte 20 ml Spritzen abgenommen. Die Isolation der PBM wurde am Tag der Blutabnahme mittels eines Ficoll-Hypaque Dichtegradienten nach Böyum et al. (9) gemacht. Nach Unterschichten von mit PBS 1:2 verdünntem Blut mit 15 ml Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und Zentrifugation bei 800g 30min wurde die Interphase, die die mononuklearen Zellen enthält, abgenommen und die Zellen 3x mit PBS/FCS 2.5% (Interchem B4, München, FRG) gewaschen. Da die Experimente nicht am Tage der Separation stattfinden konnten, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden sie nach dem letzten Zentrifugationsschritt bei 400g 10min in RPMI 1640 (Gibco Lab., Grand Island, USA)/FCS 20%/DMSO 10% (Merck, Darmstadt, FRG) in Aliquots zu 4-7 Mio aufgenommen, einem kontrolliertem Einfrierprogramm bis auf -90°C unterzogen (Planer PTC 200, Sunbury-on-Thames, England) und schliesslich in flüssigen Stickstoff transferriert. Untersuchungen konnten aufzeigen, dass Kryopreservation in DMSO weder den Phänotyp noch die Funktion der Zellen verändert (5,92).

2.3 Herstellung von hitzeaggregiertem humanen IgG

Da Vorexperimente gezeigt hatten, dass die unspezifische Bindung von IgG an Monozyten, wahrscheinlich verursacht durch Bindung an den Fc-Rezeptor, in der normalen Immunfluoreszenzmethode sehr ausgeprägt ist und vor allem bei Antigenen, die nur schwach auf der Oberfläche der Monozyten exprimiert sind, zu falsch hohen Ergebnissen führt, wurde eine Methode entwickelt, bei deren Anwendung eine Kontrolle dieser unspezifischen Bindung weitgehend möglich ist. Es zeigte sich nämlich, dass die unspezifische Bindung durch die Präinkubation der Zellen mit hitzeaggregiertem

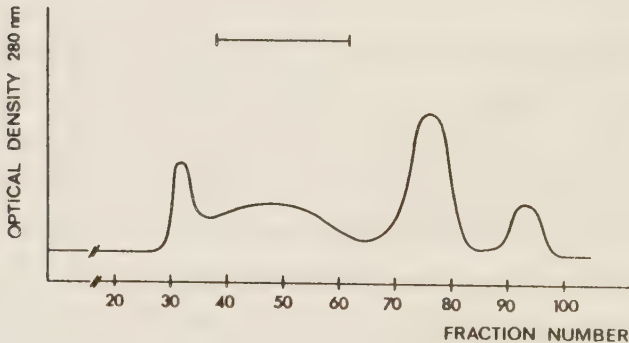


Abb.1: Gelfiltration von hitzeaggregiertem humanen IgG auf einer Sepharose B4 Säule. Es erscheinen nacheinander hochaggregiertes IgG, mittelaggregierte Oligomere von IgG, monomeres IgG und das als zusätzlicher Marker aufgetragene Dinitrophenol. Die für die Inhibition von unspezifischen Bindungsstellen verwendeten Fraktionen sind über der Kurve markiert.

humanen IgG zu einer beträchtlichen Reduktion unspezifischer Bindung führt. Für die Herstellung von aggIgG wurden 100mg von lyophilisiertem humanen IgG (Miles Lab., Elkhart, USA) in 1ml PBS rekonstituiert und für 30min bei 62° im Wasserbad hitzebehandelt. Anschliessend wurden ca. 50mg Saccharose (Merck) und 100 ml Dinitrophenol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) zugegeben und die Probe auf einer Sepharose 4B Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Abbildung 1 zeigt die Lichtabsorption bei 280nm nach der Gel-filtration. Die Fraktionen, die Oligomere von aggIgG enthalten, wurden gepoolt und durch Vaccuumdialyse in einem Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg, FRG) eingeengt. Die Konzentration, bei der aggIgG in späteren Experimenten eingesetzt wurde, wurde durch eine Titration der Bindung eines irrelevanten Maus Myelom Proteins auf den PBM eines Normalspenders ermittelt, indem die Konzentration bestimmt wurde, die gerade noch ausreichend ist um die unspezifische Bindung auf einem Minimum zu halten ohne andererseits die Bindung der spezifischen Antikörper zu inhibieren.

2.4 Monoklonale Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper wurden zum Teil in der gewünschten mit FITC bzw. Biotin gekuppelten Form von verschiedenen Herstellern bezogen, zum Teil waren die Antikörper produzierenden Hybridom-Zelllinien in den Labors des Instituts vorhanden und die Überstände der Zelllinien wurden selbst aufgereinigt und weiterverarbeitet.

Die MAB LeuM3-FITC (Becton-Dickinson, Mountain View, USA) und Mo2-FITC (Coulter Electronics, Krefeld, FRG) waren direkt mit dem Farbstoff FITC gekuppelt, der bei Anregung mit 488nm ein Grünsignal gibt, und dienten der Identifikation von Monozyten innerhalb der Gesamtpopulation der polymorphnukleären Zellen. Eigene Versuche, aufgereinigten monoklonalen Antikörper 63D3 mit FITC zu koppeln führten trotz der Anwendung mehrerer unterschiedlicher Methoden u.a. nach Goding et al. (24) nur zu einem schwachen Fluoreszenzsignal, so dass schliesslich auf die käuflichen Antikörper ausgewichen wurde. Gleichzeitig mit dem FITC-gekuppelten MAB, der Monozyten erkennt, wurden die Zellen mit einem zweiten biotinylierten Antikörper behandelt, der in dem darauf folgenden Reaktionsschritt mit Avidin-Phycoerythrin angefärbt wurde. Zur Identifikation der MHC class II Antigene wurden die MAB B7/21 (freundlicherweise von Dr. F.H. Bach und Dr. N. Reinsmoen, Minneapolis, USA zur Verfügung gestellt), Leu 10 (Becton Dickinson) und L243 (Hybridom-Zelllinie von ATCC, Rockville, USA) verwendet. Der Zellkulturüberstand der L243 Zelllinie wurde mittels Affinitätschromatographie mit Agarose gebundenen Goat-

Anti-Mouse Antikörpern (Sigma) aufgereinigt. Nach Auftragen von jeweils 100ml Zellkulturüberstand wurde die Säule mit entgastem PBS/ Na-Azid 0.02% gespült und anschliessend mit 3 M Rhodanid (Merck) eluiert. Zur Entfernung des Rhodanids wurde das Eluat anschliessend auf eine Sepharose G25 Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die den Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden gegen

MAB ¹	Antigen ²	M.w.(KD) ³	Isotype ⁴	Reference ⁵
Leu M3	monocytes, macrophages	?	IgG2b	Dimitriu-Bona, A. et al. (17)
310	granulocytes			
M522	CD 4	55	IgG1	Rieber, P. et al. (65)
2-17	CD 11	165/95	IgG1	Lohmeyer, J. et al. (44)
B7/21	transferrin-receptor	180	IgG1	Rieber, P. et al. (63)
Leu 10	HLA-DP	25/27	IgG1,2,3	Watson, A. et al. (84)
L243	HLA-DQ (polymorph)	28/32	IgG1	Chen, Y.X. et al. (14)
	HLA-DR	28/34	IgG2a	Lampson et al. (40)
MOPC 21	Irrelevant mouse myeloma	IgG	IgG1	obtained through Sigma
UPC 10	Irrelevant mouse myeloma	IgG	IgG2a	obtained through Sigma
FLOPC 21	Irrelevant mouse myeloma	IgG	IgG3	obtained through Sigma

Tab.1: Monoklonale Antikörper und ihre Charakterisierung.

- ¹ Bezeichnung der verwendeten monoklonalen Antikörper
- ² Antigene, die von den Antikörpern erkannt werden
- ³ Molekulargewicht der erkannten Antigene in Kilodalton
- ⁴ Isotyp der verwendeten monoklonalen Antikörper
- ⁵ Erstpublikation der Antikörper

PBS/ Na-Azid 0.02% (Merck) dialysiert und in einer Vakuumdialyse auf ca. 1ml eingengt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels eines SDS-Polyacrylamidgels mit konsekutiver Coomassie-Färbung des Gels kontrolliert. Der Proteingehalt wurde nach der Lowry-Methode bestimmt und zur Biotinylierung auf 0.5mg/ml eingestellt. Nach einer 12stündigen Dialyse in einem Dialyseschlauch (Serva)

gegen Carbonatpuffer pH 8.5 wurden pro 1mg Protein 0.35mg D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Boehringer, Mannheim, FRG) zugegeben, bei Raumtemperatur 2 h lang inkubiert und anschliessend gegen PBS/Na-Azid 0.02% rückdialysiert. Die MAB 2-17, M522, 310 (freundlicherweise von Prof. E.P. Rieber zur Verfügung gestellt) und B7/21 wurden nach demselben Verfahren biotinyliert. Zur Bestimmung der Fc-Rezeptoren wurden Oligomere von aggIgG, die auch bei der Inhibition unspezifischer Bindung zur Anwendung kamen, in biotinylierter Form verwendet und in der Doppelmarker-Immunfluoreszenz entsprechend dem Ablauf mit zwei MAB eingesetzt. Als Isotypkontrollen wurden die Maus Myelom Proteine MOPC 21, UPC 10 und FLOPC 21 (Sigma) sowie in einigen Experimenten die MAB 411 und 6.1 (freundlicherweise von Prof. E.P. Rieber zur Verfügung gestellt) verwendet, nachdem sie zuvor entsprechend der oben dargestellten Methode biotinyliert worden waren. Alle Reagenzien einschliesslich der käuflich erworbenen sind vor ihrer Anwendung auf PBM von Normal Spendern austitriert worden und in den konsekutiven Experimenten mit Konzentrationen im Sättigungsbereich eingesetzt worden. Die Tabelle 1 ist eine Liste der verwendeten Antikörper und deren Antigene.

2.5 Immunfluoreszenz

Polymorphnukleäre Zellen (PBM) wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in RPMI/FCS 10% 2mal gewaschen, ca. 0.5 bis 1 Mio PBM in ein 1.5ml Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 25ul aggIgG 30min bei 4°C präinkubiert. Anschliessend wurden 12.5ul LeuM3-FITC (Becton-Dickinson) und 12.5ul des zweiten biotinylierten Antikörpers zugegeben und weitere 30min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS/FCS 2.5%/Na-Azid 0.02% gewaschen und anschliessend mit Avidin-Phycoerythrin 1:2.5 (Becton-Dickinson) 30min bei 4°C inkubiert. Nach 2 weiteren Waschvorgängen wurden die Zellen schliesslich in PBS/Paraformaldehyd 1% (Merck) aufgenommen. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd war es möglich die Proben bis zu 7 Tage nach der Anfärbung der Zellen in der Flowzytometrie zu analysieren, wenn sie bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurden (42,43) ohne dass sich bezüglich der Anzahl der positiven Zellen und der Fluoreszenzintensität Alterationen ergaben.

2.6 Flowzytometrische Analyse

Bei der flowzytometrischen Analyse werden die Zellen einzeln und von Hüllflüssigkeit umgeben an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Grösse, den charakteristischen intrazellulären Strukturen und der Fluoreszenzmarkierung mit spezifischen Antikörpern wird von jeder Zelle ein Lichtsignal von bestimmter Intensität, Richtung und Längenwelle reflektiert. Dieses Lichtsignal wird bei jeweils 90° und 180° Ablenkung und nach Durchlaufen mehrerer Farbfilter unterschiedlicher Wellenlänge von Photomultipliern in ein elektrisches Signal umgewandelt und mittels eines Computers analysiert. Für die flowzytometrische Analyse wurde ein EPICS V (Coulter Electronics), der mit einem Argonlaser ausgestattet ist, verwendet. Der Laser wurde mit 350 mW bei 488nm gefahren und die Lichtstreuungssignale dazu benützt, tote Zellen als solche zu identifizieren. Diese wurden dann in der weiteren Analyse durch das Signalverarbeitungssystem MDADS des EPICS nicht mehr weiter auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht und nicht der statistischen Analyse zugeführt. Fluoreszenzsignale wurden bei Kanal 210 einer logarithmischen Skala mittels 6.25% Bright beads (Coulter Electronics) bei Spannungen von ca. 1200V für den grünen und ca. 1100V für den gelben Photomultiplier kalibriert. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels eines dichroischen 550 nm longpass Spiegels auf den grünen Photomultiplier mit einem 525nm bandpass Filter und auf den gelben Photomultiplier mit einem 575nm bandpass Filter gerichtet. Durch diese Einstellung war die Überlappung des Spektrums von Gelb- und Grünsignalen so gering, dass auf eine weitere Korrektur

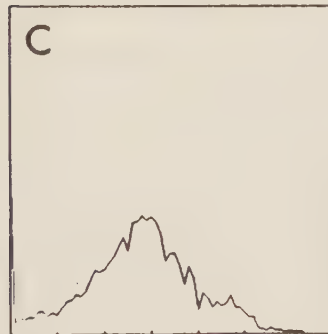
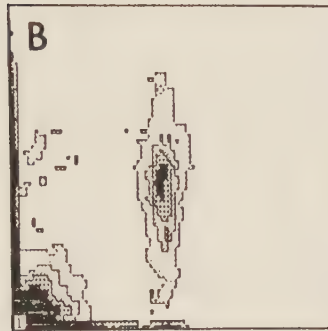
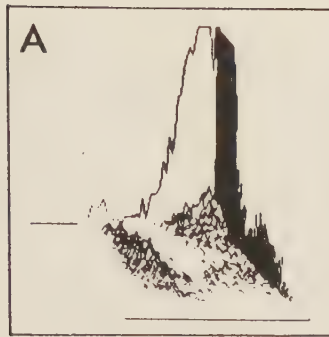


Abb.2: Flowzytometrische Analyse einer Doppelmarker-Immunfluoreszenz mit LeuM3 (Monozyten) und L243 (HLA-DR). Die Abbildung zeigt die Anfärbung von PBMC eines Normalpenders mit den beiden Antikörpern in verschiedenen Darstellungen. Abb.2a: Dreidimensionale Darstellung mit der Grünfluoreszenz von LeuM3 auf der x-Achse, der Gelbfluoreszenz von L243 auf der y-Achse und der Anzahl an positiven Zellen auf der z-Achse. Abb.2b: Zweidimensionale Darstellung mit der Grünfluoreszenz von LeuM3 auf der x-Achse und der Gelbfluoreszenz von L243 auf der y-Achse. Die einzelnen Zellpopulationen sind mittels Höhenlinien wiedergegeben, die aufgrund eines Schnitts in vorgegebener Höhe entstehen. Abb.2c: Projektion auf die Gelbfluoreszenz der LeuM3⁺ Zellen mit der Anzahl an positiven Zellen auf der y-Achse und der Gelbfluoreszenz auf der x-Achse. Mit Hilfe der unterschiedlichen Darstellungsweisen lässt sich der zu untersuchende Parameter optimal darstellen. Bei der in der Abbildung gezeigten Expression von HLA-DR ist aufgrund der relativ starken Expression von HLA-DR auf Monozyten die HLA-DR⁺ Subpopulation scharf abgegrenzt.

der Signalstärke im jeweiligen Farbkanal mittels eines Subtraktionsprogrammes verzichtet werden konnte. Pro Probe wurden wenigstens 10.000 Zellen analysiert und die Auswertung wurde entweder mit der 3/1 Software des EPICS V MDADS Systems gemacht oder aber mittels eines von P. Rohwer, Erlangen, FRG, entworfenen Programmes auf einem SAM 68K Personal Computer (KWS, Ettlingen, FRG). Zur Bestimmung der für das jeweilige Antigen positiven Monozyten wurde die Subpopulation der LeuM3 positiven Zellen in einer Projektion auf die Gelbfluoreszenz untersucht. Im Falle einer Überlappung zwischen der Anfärbung mit dem spezifischen Antikörper und der des irrelevanten Kontrollantikörpers wurde ein Programm verwendet, welches für jeden Kanal die durch unspezifische Bindung verursachte Anfärbung von der durch die Bindung mit dem spezifischen Antikörper verursachten subtrahiert (Coulter Electronics). Bei der Analyse der Fluoreszenzsignale wird den Zellen je nach Intensität der Anfärbung mit dem Fluoreszein-Farbstoff markierten Antikörper ein bestimmter Kanal (cha) zugeordnet. Die angegebene spezifische Fluoreszenzintensität ist die mittlere Kanalzahl der positiven Zellen auf einer logarithmischen Skala mit 64 Kanälen, die sich bei Addition der Kanalzahlen sämtlicher für das betreffende Antigen positiver Zellen und Division dieser Summe durch die Anzahl der positiven Zellen ergibt. Sie stellt infolgedessen ein relatives Mass für die Anzahl der exprimierten Moleküle pro Zelle dar. Die Abbildung 2 zeigt, wie bei der Analyse der Daten durch die Wahl unterschiedlicher Parameter in der Darstellung eine optimale Auswertung der Doppelmarker-Immunfluoreszenz ermöglicht wird.

2.7 Herstellung von adhärenenten Zellen

Zur Produktion von kulturierten Monozyten wurden PBM in Kulturmedium RPMI/FCS 10% resuspendiert, welches 100 ng/ml Lipopolysaccharide (Sigma) enthielt, und anschliessend ca. $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen in eine 40mm Gewebekulturschale (Nunc, Kamstrup, Dänemark) gegeben. Nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Hanau, FRG), wurde der Überstand entfernt und die adhärenenten Zellen mittels 10 minütiger Inkubation mit 1mM EDTA (Merck) abgelöst. Die Zellen wurden 2x in RPMI/FCS 10% (Flow Lab., Meckenheim, FRG) gewaschen und in einer Doppelmarker-Immunfluoreszenz entsprechend der oben angegebenen Methode eingesetzt.

2.8 Mitogenstimulation

Nach dem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen 2x mit RPMI/FCS 10% gewaschen und 125ul der Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben. Durch Zugabe von jeweils 50ul Mitogen wurde eine Endkonzentration von 12,5ul/ml für Concanavalin A (Serva, Heidelberg, FRG), 0.5ug/ml für Phytohämagglutinin (Wellcome Diagnostics, Dartford, England) und 1ug/ml für Pokeweed Mitogen (E.Y. Labs. Inc., San Mateo, USA) eingestellt. Nach einer Inkubation von 90h bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank wurde den Zellen 1uCi ³H-Thymidin

(DuPont, Newtown, USA) pro well zugegeben und weitere 6h im Brutschrank inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit einem Zellharvester (Skatron, Lierbyen, Norwegen) geerntet und die aufgenommene Radioaktivität in einem β -Counter (LKB, Bromma, Schweden) gemessen. Vom experimentellen Wert wurde der Leerwert der Zellen ohne Zugabe des Mitogens abgezogen. Als Kontrolle dienten die PBM von 3 gesunden Normalspendern.

2.9 Herstellung und Kontrolle pyrogenfreier Materialien

Zur Kontrolle der LPS-Haltigkeit wurden zwei unterschiedliche Testsysteme verwendet. Der LAL-Test (Mallinckrodt, Dietzenbach, FRG) beruht auf einer Gelbildung eines Limulus-Amöbozyten-Lysats in Kontakt mit LPS. Die verwendete Charge besass eine Empfindlichkeit von 33pg/ml LPS. Der TNF-Test wurde in unserem Labor entwickelt und besitzt eine wesentlich höhere Empfindlichkeit von ca. 1pg/ml LPS. Er beruht auf der Tatsache, dass PBM eines Normalspenders, wenn man sie zusammen mit dem zu testenden Material 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, α TNF produzieren, welches in einem konsekutiven WEHI 164 Test zu erhöhten ^{51}Cr -Release Werten führt. Im pyrogenfreien WEHI 164 Testsystem wurden dann ausschliesslich getestetes Material wie 96-well-Mikrotiterplatten (Costar, Cambridge, USA), Pipettenspitzen (Ratiolab, Dreieich, FRG), FCS (Interchem B4) und RPMI 1640 (Gibco) verwendet. Die während des WEHI 164 Tests verwendeten Glasmaterialien wie z.B. Glasflaschen wurden vor der Verwendung 4h bei 180°C hitzebehandelt.

2.10 Ermittlung der TNF-Produktion

Die Fähigkeit von Monozyten α TNF freizusetzen wurde mit Hilfe von mit Actinomycin D vorbehandelten Targetzellen der Maus Fibrosarkom Zelllinie WEHI 164 in einem ^{51}Cr -Releasetest ermittelt (15,92). Untersuchungen hatten gezeigt, dass WEHI 164 Act.D Zellen spezifisch durch Monozyten lysiert werden, jedoch nicht durch NK-Zellen (68,92), und dass dies mittels des Mediator-moleküls α TNF geschieht (91). Beim ^{51}Cr -Releasetest wird intrazytoplasmatisches radioaktiv markiertes Chromat bei der Lyse der Targetzellen, welche durch α TNF verursacht wird, freigesetzt. Je nach Menge des von stimulierten Monozyten produzierten α TNF werden mehr oder weniger Targetzellen lysiert und entsprechend auch mehr oder weniger radioaktiv markiertes Chromat freigesetzt. Die Produktion von α TNF ist bei unstimulierten Monozyten sehr niedrig und kann mittels LPS (91), γ -interferon und IL 1 (57) wesentlich gesteigert werden. Um sowohl die α TNF-Produktion ohne als auch mit LPS-Stimulation zu untersuchen wurden zunächst alle nachfolgend beschriebenen Schritte mit pyrogenfreien Materialien gemacht und anschliessend pro Patient zwei Titrationsreihen angefertigt, wobei in jeweils eine Titrationsreihe exogen LPS zugegeben wurde. Die als Targetzellen verwendeten WEHI 164 Zellen wurden mit Actinomycin D (Calbiochem-Behring Corp., Frankfurt, FRG) in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ für 2h vorbehandelt, mit $0.1\text{ mCi Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear Corp., Dreieich, FRG) 1h lang markiert, und schliesslich nach 3 Waschvorgängen mit RPMI/FCS 10% mit einer Konzentration von $5 \times 10^3/\text{well}$ zu den

Effektorzellen gegeben. Die als Effektorzellen verwendeten PBM wurden nach dem Auftauen 2x mit RPMI/FCS 10% gewaschen, auf eine Konzentration von 1.5×10^6 /ml eingestellt und je 100ul in Triplikates auf einer 96-well-Mikrotiterplatte (Costar, Cambridge, USA) in Verdünnungsstufen von 1:3 austitriert. Nach dem Zugabe der Targetzellen wurde so ein E:T-Ratio von 30:1 bis zu 0.1:1 erreicht. In jeweils eine Titrationsreihe eines Patienten wurde vor Zugabe der Effektorzellen noch exogen Lipopolysaccharid von Salmonella minnesota (Sigma) in einer Endkonzentration von 1ug/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 7h bei 37°C im Brutschrank wurden jeweils 125ul/well Überstand abgenommen und die freigesetzte Radioaktivität in einem γ -Counter (Packard, Warrenville, USA) bestimmt. Die spezifische ^{51}Cr -Freisetzung wurde mit Hilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

Um die Tag-zu-Tag-Variabilität zu eliminieren und damit die Ergebnisse von Normal Spendern und Patienten besser vergleichen zu können, wurde das E:T-Ratio bei einem ^{51}Cr -Release von 30% nach LPS-Stimulation ermittelt und die Lytischen Einheiten pro 10^6 Effektorzellen bestimmt, wobei die Zahl der Effektorzellen, die benötigt wurden, um ein Specific Release von 30% zu bewirken, als eine Lytische Einheit (LU) definiert wurde. Anschliessend wurde

der so ermittelte experimentelle Wert eines jeden Patienten durch einen Standardwert dividiert, der mit Hilfe einer bei jedem Experiment mitlaufenden Probe von Zellen eines gesunden Normal-spenders gewonnen wurde.

Bei den Neutralisationsexperimenten wurde der gegen α TNF gerichtete Antikörper 195/8 (Dr. A. Möller, BASF, FRG) verwendet. Als Kontrollantikörper diente ein irrelevanter monoklonaler Antikörper (FLOPC 21) des gleichen Isotyps. Die mononukleären Zellen von 2 Normalspendern und 2 Patienten mit AIDS wurden eingestellt auf 1×10^6 Zellen/ml und je 5×10^6 Zellen 4 Stunden bei 37°C mit 1 ug/ml LPS stimuliert. Der Überstand der Zellen wurde filtriert und 50 μl davon zusammen mit 50 μl des MAB 195/8 (Verdünnung $1:2^6$ ausgehend von einer Konzentration von 0.1 mg/ml) oder mit 50 μl des MAB FLOPC 21 in der gleichen Konzentration auf 100 μl Actinomycin D vorbehandelter, ^{51}Cr -markierter WEHI 164 Zellen der Konzentration 5×10^5 Zellen/ml gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 7h bei 37°C wurde das freigesetzte ^{51}Cr in 100 μl Überstand gemessen.

2.11 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Zur Berechnung des statistischen Signifikanzniveaus wurde der Student's t-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Immunologische Charakterisierung der Patienten

Um zu zeigen, dass die untersuchten Patienten ausser der klinischen Symptomatik auch schwerwiegende Defekte auf zellulärer Ebene besitzen, wurden zwei immunologische Parameter bestimmt, die eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Immunsystems mittels in-vitro Untersuchung der polymorphnukleären Zellen zulassen. Zunächst wurde bei den einzelnen Patienten das Verhältnis der CD4⁺ Lymphozyten zu den CD8⁺ Lymphozyten (CD4/CD8-Ratio) sowie die Absolutzahl an CD4⁺ Lymphozyten pro μ l Blut bestimmt (Tab.2). Die Zahl der CD4⁺ Lymphozyten war bei HIV seropositiven

PATIENTS	N	CD4 ⁺ LYMPHOCYTES/ μ L	CD4/CD8 RATIO
CONTROLS	16	1077 $\pm$ 728	2.08 $\pm$ 0.77
HIV ⁻ HPH ¹	8	862 $\pm$ 310	1.48 $\pm$ 0.50
HIV ⁺ HPH ²	8	561 $\pm$ 303	1.11 $\pm$ 0.65
ARC ³	10	599 $\pm$ 527	0.87 $\pm$ 0.61
AIDS ⁴	19	209 $\pm$ 253	0.38 $\pm$ 0.38

Tab.2: Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten im peripheren Blut und CD4/CD8-Ratio.

- ¹ keine signifikante Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe
² signifikant erniedrigt (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe
³ signifikant erniedrigt (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.025$) im Vergleich zur Kontrollgruppe
⁴ signifikant erniedrigt (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.0005$) im Vergleich zur Kontrollgruppe

Hämophilen, Patienten mit ARC und Patienten mit AIDS im Vergleich zu sechzehn gesunden Kontrollpersonen signifikant erniedrigt. Die Untersuchungen ergaben bei dem Patientenkollektiv mit AIDS 209 ± 253 $CD4^+$ Lymphozyten pro μl Blut, bei ARC 599 ± 527 $CD4^+$ Lymphozyten/ μl und bei HIV seropositiven Hämophilen 561 ± 303 $CD4^+$ Lymphozyten/ μl , im Vergleich zu 1077 ± 728 $CD4^+$ Lymphozyten/ μl bei den Kontrollpersonen. Auffallend war, dass bereits HIV seropositive Hämophile ohne klinische Symptomatik eine beträchtliche Verminderung von $CD4^+$ Lymphozyten im peripheren Blut zeigten (Abb. 3). Bei der Bestimmung der Anzahl der zirkulierenden

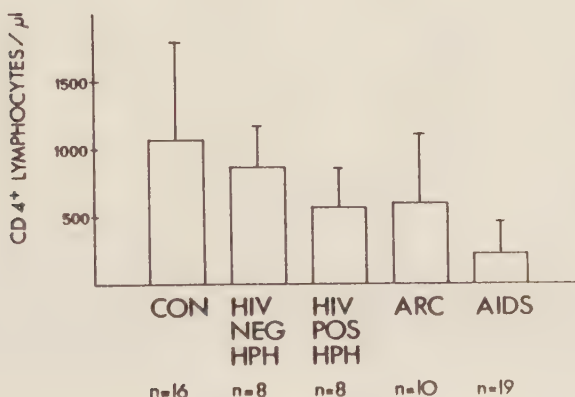


Abb.3: Absolutzahl der $CD4^+$ Lymphozyten pro μl Blut in den untersuchten Patientenkollektiven. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für n Patienten. Die Patienten mit AIDS, ARC und HIV seropositive Hämophile zeigten gegenüber den gesunden Kontrollpersonen eine signifikante Erniedrigung der absoluten Zahl an $CD4^+$ Lymphozyten im peripheren Blut. Die Patienten mit AIDS, deren Diagnose aufgrund ihrer klinischen Symptomatik und der Zugehörigkeit zu Risikogruppen gestellt worden war, zeigten folglich auch bezüglich dieses immunologischen Parameters eine für AIDS typische Charakteristik.

Monozyten im peripheren Blut zeigte sich eine signifikante Verminderung ($p < 0.05$) bei AIDS-Patienten (278 ± 185 Monozyten/ μ l) im Vergleich zu den Kontrollpersonen (390 ± 123 Monozyten/ μ l).

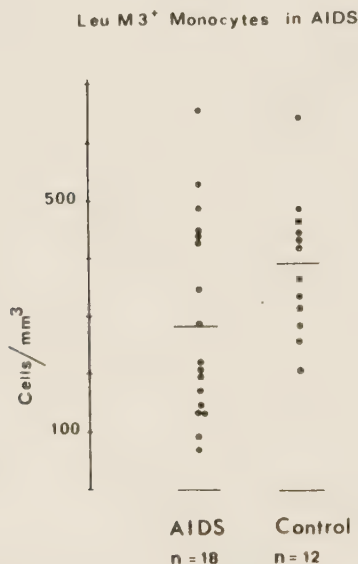


Abb. 4: Absolutzahl der LeuM3⁺ Monozyten pro μ l Blut bei Patienten mit AIDS und bei Kontrollpersonen. Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Monozyten bei den Patienten mit AIDS (278 ± 185 Monozyten/ μ l) im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen (390 ± 123 Monozyten/ μ l).

Als weiterer immunologischer Parameter wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Stimulation mit den Mitogenen Phytohämagglutinin (PHA), Pokeweed Mitogen (PWM) und Concanavalin A (ConA) bei 5 Patienten mit AIDS (Tab.3) und 5

Patienten mit ARC (Tab.4) untersucht. Bei diesen Patienten handelte es sich um solche, die sowohl bezüglich ihrer Oberflächenantigene als auch bezüglich ihrer α TNF-Produktion untersucht worden waren. Die Patienten mit AIDS zeigten konsistent

Patients	ConA	PHA	PWM
AL.	74.272 [*]	143.451	31.120
HA.	85.538	110.591	8.515
SI.	49.229	57.403	17.139
Controls	69.680 ±18.585	103.815 ±43.422	18.925 ±11.408
BA.	2.712	4.214	1.060
SC.	9.461	14.128	6.196
IN.	595	259	2.547
RE.	23.315	23.264	3.731
MU.	10.512	8.178	1.448
AIDS	9.319 ±8.304	10.029 ±9.046	2.996 ±2.069

Tab.3: Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten nach Mitogenstimulation bei Patienten mit AIDS.

* Aufnahme an radioaktiv (3H) markiertem Thymidin in cpm infolge Proliferation der Zellen nach Stimulation mit den Mitogenen Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed Mitogen. Bezüglich aller drei Mitogene zeigten die fünf untersuchten Patienten mit AIDS eine statistisch signifikante Erniedrigung mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$.

eine schwere Defizienz bezüglich der Fähigkeit zur Proliferation nach Mitogenstimulation. So zeigte sich z.B. bei PHA eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit auf unter 10% der

Kontrollpersonen (Tab.3). Bei den Patienten mit ARC war das Bild weniger konsistent: zwei Patienten zeigten eine beträchtliche Verminderung der Proliferationsfähigkeit, während bei den anderen drei Patienten eher eine Steigerung festzustellen war (Tab.4).

Patients	ConA	PHA	PWH
AL.	8.254*	30.143	1.218
HA.	15.662	60.484	1.616
SI.	15.570	21.592	669
Controls	13.162 ±4.250	37.406 ±20.438	1.168 ±475
MÜ.	322	921	603
RI.	942	25.163	291
SW.	51.688	81.303	12.497
PI.	21.051	49.155	5.653
RA.	23.552	67.590	6.394
ARC	19.507 ±21.022	44.826 ±32.333	4.971 ±5.145

Tab.4: Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten nach Mitogenstimulation bei Patienten mit ARC.

* Aufnahme an radioaktiv (^3H) markiertem Thymidin in cpm infolge Proliferation der Zellen nach Stimulation mit den Mitogenen Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed Mitogen. Bei den beiden Patienten MÜ. und RI. zeigte sich eine zum Teil erheblich verminderte Proliferationsfähigkeit, während die drei Patienten SW., PI. und RA. eher erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollpersonen zeigten.

3.2 Untersuchung der Oberflächenantigene auf Monozyten

3.2.1 Kontrolle der unspezifischen Bindung

In Vorexperimenten wurde eine relativ hohe unspezifische Bindung der irrelevanten Kontrollantikörper an die Monozytenoberfläche festgestellt, die wahrscheinlich durch die Bindung der MAB an den Fc-Rezeptor verursacht wurde. Diese unspezifische Bindung war abhängig vom Isotyp des verwendeten Antikörpers und war für einen beträchtlichen Anteil der Bindung der spezifischen Antikörper an Monozyten verantwortlich. Während Kontrollantikörper des Isotyps IgG2a eine starke Bindung zeigten, wurde nur eine schwache Bindung von Kontrollantikörpern des Isotyps IgG3 registriert. Hinsichtlich des Isotyps IgG1 herrschte ein Polymorphismus zwischen den einzelnen Personen mit zum Teil starker Bindung in einigen Fällen, während die Monozyten der Mehrzahl der untersuchten Personen nur eine schwache Bindung von IgG1 zeigten. Die Vorinkubation der Zellen mit Humanserum genügte nicht um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Dies wurde erst mittels Vorinkubation der Zellen mit Oligomeren von hitze-aggregiertem humanen IgG erreicht. Ein Beispiel für die Suppression unspezifischer Bindung des irrelevanten Maus Myelom Proteins UPC 10 (IgG2a) gibt Abb.5, in der 58.3% der Zellen ohne (c) und 12.7% der Zellen mit aggIgG Vorinkubation (b) als positiv bestimmt wurden im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne monoklonalen Antikörper (a). Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Isotypkontrollen MOPC 21 (IgG1) und FLOPC 21 (IgG3) erreicht. Da

andererseits bei sehr hohen Konzentrationen von aggIgG nicht nur die unspezifische Bindung inhibiert wurde, sondern auch die spezifische Bindung monoklonaler Antikörper beeinträchtigt wurde, musste aggIgG in einer genau austitrierten Konzentration eingesetzt werden. Dazu wurde die Bindung von irrelevanten und

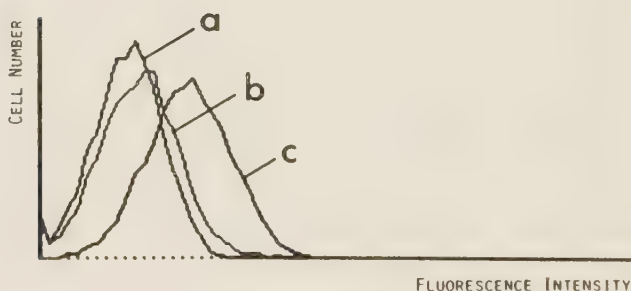


Abb.5: Flowzytometrische Analyse der Bindung eines irrelevanten Maus Myelom Proteins UPC 10 (IgG2a) auf Monozyten des peripheren Blutes ohne und mit Vorinkubation mit aggIgG. Die Fluoreszenzintensität ist auf einer logarithmischen Skala auf der x-Achse und die Zellzahl auf der y-Achse angegeben. Die Kurve a zeigt die Anfärbung mit Avidin-Phycoerythrin ohne Antikörper (Negativkontrolle), die Kurve b die Anfärbung nach einer Vorinkubation der Zellen mit aggIgG und die Kurve c die Anfärbung ohne Vorinkubation. Die unspezifische Bindung konnte durch die Blockade der Fc-Rezeptor vermittelten Bindung beträchtlich reduziert werden. Nach der Vorinkubation der Zellen mit aggIgG wurden 12.7% der Monozyten als positiv bestimmt, während ohne Vorinkubation 58.3% der Monozyten positiv waren.

spezifischen Antikörpern bei verschiedenen aggIgG-Konzentrationen einander gegenübergestellt (Abb.6). Eingesetzt wurde aggIgG schliesslich in einer Konzentration, bei der ein beträchtlicher

Konzentration. In einigen Experimenten wurden zusätzlich die MAB 6.1 (IgG1) gegen CD5 und 4.11 (IgG1) gegen CD6, die nicht auf Monozyten binden, als Negativ-Kontrollantikörper verwendet. Diese MAB ergaben eine erhöhte unspezifische Bindung im Vergleich zu dem Maus Myelom Protein UPC 10 und entsprechend eine Abnahme der als positiv bestimmten Zellen bei der Anfärbung mit spezifischen Antikörpern, jedoch war diese Abnahme konsistent bei allen Proben vorhanden und führte nicht zu einer spezifischen Differenz zwischen Patienten und Normalspendern.

In allen nachfolgenden Experimenten wurde aufgrund dieser Vor-experimente mit aggIgG präinkubiert um auf diese Weise die unspezifische Bindung der Immunglobuline an die Monozytenoberfläche möglichst niedrig zu halten und tatsächlich nur die spezifische Anfärbung zu messen.

3.2.2 Charakterisierung von LeuM3⁺ Zellen

Zur Kontrolle, dass die durch den MAB LeuM3 erkannten Zellen tatsächlich Monozyten und nicht gleichzeitig auch grössere Subpopulationen anderer polymorphnukleärer Zellen sind, wurde die Subpopulation der LeuM3⁺ Zellen bezüglich ihrer Eigenschaften im Lichtstreuungsdiagramm (Abb.7) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass unter den polymorphnukleären Zellen eine singuläre Population erkannt wird, die bezüglich ihrer Lichtstreuungseigenschaften identisch ist mit morphologisch definierten Monozyten (Abb.7c&d). Untersucht man andererseits die mittels Lichtstreuungsdiagramm bestimmten Monozyten auf die Expression von LeuM3 hin, so stellt man fest, dass lediglich eine Subpopulation der so ermittelten Monozyten LeuM3 exprimiert (Abb.7e&f). Dieses Ergebnis ist jedoch dadurch zu relativieren, dass die Lichtstreuungssignale von Lymphozyten und Monozyten nicht absolut stringent getrennt sind, sondern zum Teil ineinander übergehen, so dass bei den mittels Lichtstreuungsdiagramm ermittelten Monozyten noch eine relativ grosse Anzahl an Lymphozyten zu finden ist. Aufgrund dieser Tatsache wurde dann schliesslich die Strategie eingeschlagen, Monozyten nicht mittels Lichtstreuungsdiagramm sondern durch einen zweiten monoklonalen Antikörper, der die überwiegende Mehrzahl der Monozyten des peripheren Blutes erkennt, in einer Doppelmarker-Immunfluoreszenz zu identifizieren.

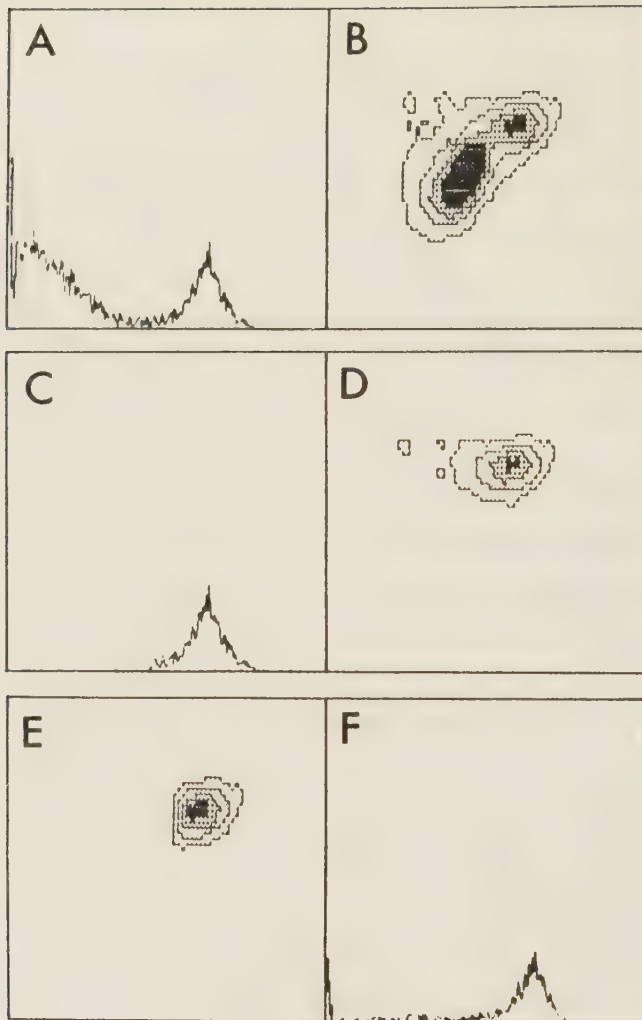


Abb.7: Grünfluoreszenz und Lichtstreuung von LeuM3⁺ Monozyten. In den Abbildungen, in denen die Grünfluoreszenz gezeigt wird (Abb.7a&c&f) ist auf der x-Achse die Grünfluoreszenz und auf der y-Achse die Anzahl der positiven Zellen abgetragen. In den Lichtstreuungsdiagrammen (Abb.7b&d&e) ist die Lichtstreuung bei 180° auf der x-Achse und die Lichtstreuung bei 90° auf der y-Achse abgetragen. Abb.7a: Grünfluoreszenz der Gesamtpopulation von PBM. In der Abbildung sind LeuM3⁺ und LeuM3⁻ Subpopulationen erkennbar. Abb.7b: Lichtstreuungsdiagramm der Gesamtpopulation von PBM. Auch hier sind zwei Subpopulationen unterscheidbar, die sich jedoch nur wenig deutlich voneinander abgrenzen lassen. Die Population links unten stellt Lymphozyten dar und in der Population rechts oben befinden sich die Monozyten, wie sich anhand morphologischer Kriterien im Lichtmikroskop oder anhand der Fähigkeit zur Phagozytose von Latex Beads zeigen lässt. Abb.7c: Grünfluoreszenz von LeuM3⁺ Zellen ohne die LeuM3⁻ Zellen. Abb.7d: Lichtstreuungsdiagramm der in Abb.7c gezeigten Zellen. Erkennbar ist, dass die LeuM3 positiven Zellen im Lichtstreuungsdiagramm eine singuläre Population darstellen, die sich an der Stelle im Lichtstreuungsdiagramm befinden, wo die Monozyten lokalisiert sind. Abb.7f: Grünfluoreszenz der im Lichtstreuungsdiagramm Abb.7e als Monozyten imponierenden Zellen. Ein Teil der im Lichtstreuungsdiagramm als einheitliche Population erscheinenden Zellen sind LeuM3 negativ.

3.2.3 Einfluss der Fixierung auf die Immunfluoreszenz

Aufgrund der grossen Anzahl an untersuchten Oberflächenantigenen und Patienten und aufgrund des Arbeitsablaufs mit drei Inkubationsschritten war es notwendig, die angefärbten Zellen zu fixieren, um auf diese Weise die Analyse in der Flowzytometrie an einem der darauffolgenden Tage zu ermöglichen. Die von Lanier et al. beschriebene Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (42) führt zu einer Inaktivierung von HIV (43) und erlaubt zum anderen die Analyse in der Flowzytometrie bis zu einer Woche nach der Anfärbung der Zellen. Untersuchungen hatten weiterhin

Antibody	Unfixed Cells ^a		Fixed Cells	
	1. Day	2. Day	1. Day	2. Day
Control	0.0	0.0	0.0	0.0
LeuM3	17.5	18.3	20.7	19.4
L243	39.2	40.3	43.7	40.8
LeuM3/L243	16.5	15.0	19.7	17.6

Tab.5: Einfluss der Fixierung mit Paraformaldehyd auf die Untersuchung von Monozyten in der Immunfluoreszenz.

^a Prozentsatz an positiven Zellen ohne und mit Fixierung durch Paraformaldehyd am Tage der Anfärbung der Zellen mit LeuM3 und L243 (HLA-DR), sowie am darauf folgenden Tag. Die Untersuchungen ergaben keine grösseren Veränderungen bezüglich der Anzahl an LeuM3⁺ bzw. L243⁺ Zellen, beide MAB wurden nach der Fixierung sogar auf einer etwas grösseren Anzahl an Zellen als vor der Fixierung entdeckt.

gezeigt, dass sich die Anzahl der positiven Zellen in einer Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen HLA-DR (83), CD3, CD4 und CD8 (43) durch die Fixierung mit Paraformaldehyd nicht verändert. Da aufgrund der starken Tendenz von Monozyten, in Zellsuspensionen zu verklumpen und dadurch für die flowzytometrische Analyse auszufallen, nicht auszuschliessen war, dass bei der Fixierung mit Paraformaldehyd infolge Bildung von Monozytenaggregationen Verschiebungen zwischen einzelnen Subpopulationen von Monozyten stattfinden, wurde in einem Experiment überprüft, ob sich die Zahl der LeuM3⁺ Monozyten innerhalb der Gesamtpopulation der polymorphnukleären Zellen bei der Fixierung mit Paraformaldehyd verändert. Ausserdem wurde anhand der Expression von HLA-DR auf LeuM3⁺ Monozyten untersucht, ob sich möglicherweise Verschiebungen innerhalb der Monozytenpopulation ergeben. Bei der Anzahl an positiven Zellen bezüglich der MAB LeuM3 und L243 (HLA-DR) ergaben sich keine grösseren Veränderungen nach der Fixierung, beide MAB wurden nach der Fixierung sogar auf einer grösseren Anzahl an Zellen als vor der Fixierung entdeckt (Tab.5). Von den LeuM3⁺ Zellen waren ohne Fixierung 94.3% und mit Paraformaldehyd-Fixierung 95.3% HLA-DR positiv.

3.3 Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten von Patienten mit HIV-Infektion

3.3.1 Expression auf frischen Monozyten

Monozyten von Patienten mit AIDS, ARC und HIV seropositiven und seronegativen Hämophilen ohne klinische Symptomatik wurden bezüglich ihrer Expression von CD4 und anderen funktionell wichtigen Oberflächenantigenen wie CD11 (C3bi-Rezeptor), Fc-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor und die drei MHC class II Antigene HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR untersucht. Die Expression dieser Oberflächenantigene wurde mittels einer Doppelmarker-Immunfluoreszenz analysiert, bei der Monozyten durch den FITC-gekoppelten MAB LeuM3 identifiziert wurden und die Oberflächenantigene mit Hilfe eines Panels von biotinylierten Antikörpern bestimmt, die mit dem gelben Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin angefärbt wurden. Auf diese Weise behandelt zeigten positive Monozyten eine Doppelfärbung mit LeuM3 (grün) und dem jeweils verwendeten zweiten Antikörper (gelb), während sich negative Monozyten nur mit LeuM3 anfärbten. Die Abbildung 8b zeigt die Anfärbung von PBM einer gesunden Kontrollperson mit LeuM3 und 310 (CD4) in einem zweidimensionalen Schaubild mit der Grünfluoreszenz von LeuM3 auf der x-Achse und der Gelbfluoreszenz von 310 auf der y-Achse. Die CD4⁺ Helferzellen zeigen eine starke Anfärbung mit dem MAB 310, wohingegen die mit 310 angefärbten CD4⁺ Monozyten (LeuM3⁺) nur eine wesentlich geringere Anfärbung mit 310 zeigen. Die Zellen dieser Kontrollperson wurden in Abb. 8a mit LeuM3 und dem Kontroll-

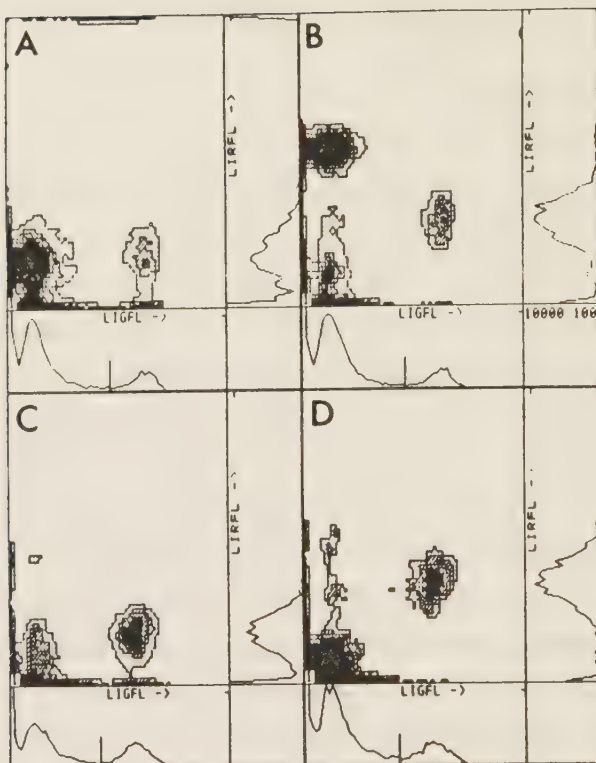
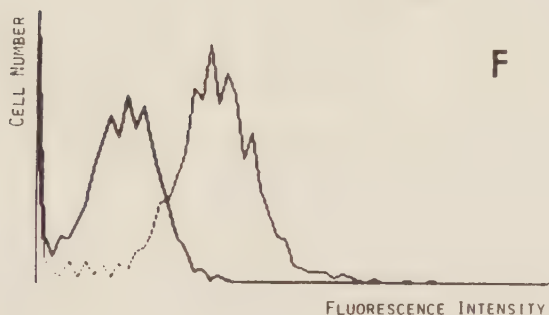
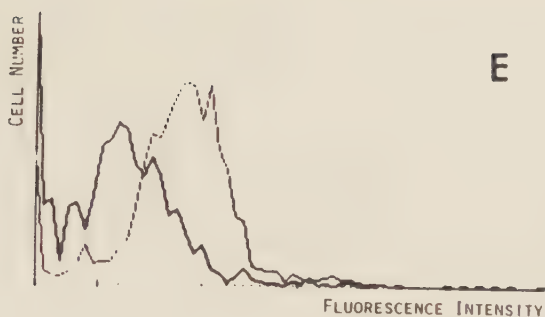


Abb.8: Doppelmarker-Immunfluoreszenz von PBH bei Anfärbung mit den monoklonalen Antikörpern LeuM3 (Monozyten) und 310 (CD4). Die Anfärbung mit LeuM3 und 310 ist in einem zweidimensionalen Schaubild mit der Grünfluoreszenz von LeuM3 auf der x-Achse und der Gelbfluoreszenz von 310 auf der y-Achse angegeben. Die Abbildungen auf der unteren und rechten Seite jedes zweidimensionalen Schaubilds zeigen Projektionen auf die Grünfluoreszenz (unten) und die Gelbfluoreszenz (rechts). Die Abbildungen auf der rechten Seite zeigen Projektionen der LeuM3⁺ Zellen, während die unteren Abbildungen Projektionen der Gesamtpopulation sind. Abb.8a: Anfärbung mit LeuM3 und MOPC 21 (Isotyp-Kontrollantikörper) bei einer gesunden Kontrollperson. Abb.8b: Anfärbung mit LeuM3 und 310 (CD4) bei derselben Kontrollperson. Die CD4⁺ Lymphozyten zeigen eine starke Anfärbung, während CD4⁺ Monozyten nur schwach mit dem MAB 310 angefärbt werden. Abb.8c: Anfärbung mit LeuM3 und MOPC 21 bei einem Patienten mit AIDS (CD4/CD8-Ratio 0.01). Abb.8d: Anfärbung mit LeuM3 und 310 bei dem Patienten mit AIDS. Eine beträchtliche Verringerung der CD4⁺ Lymphozyten ist erkennbar, wohingegen die CD4⁺ Monozyten nicht abgenommen haben im Vergleich zur Kontrollperson. Abb.8e: Vergleich der Gelbfluoreszenz mit MOPC 21 und 310 auf LeuM3⁺ Monozyten bei der Kontrollperson. Die Bestimmung der Anzahl an Monozyten, die das CD4 Molekül an ihrer Oberfläche exprimieren ergibt 54.0% CD4⁺ Monozyten. Abb.8f: Vergleich der Gelbfluoreszenz mit MOPC 21 und 310 auf LeuM3⁺ Monozyten bei dem Patienten mit AIDS. Bei diesem Patienten waren 74.6% der Monozyten CD4 positiv.



antikörper MOPC 21 angefärbt. Die Antikörper 310 und MOPC 21 besitzen den identischen Isotyp IgG1. Die Anzahl der positiven Monozyten wurden mit Hilfe einer Projektion auf die Gelbfluoreszenz der LeuM3⁺ Zellen bestimmt. Dazu wurden die beiden Projektionen von 310 und MOPC 21 übereinandergelegt (Abb. 8e) und mittels eines Subtraktionsprogrammes die Anzahl der positiven Zellen bestimmt. Bei der gezeigten Kontrollperson wurden auf diese Weise 54.0% CD4 positive Monozyten ermittelt. In Abb. 8c ist die Anfärbung mit LeuM3/MOPC 21 und in Abb. 8d die Anfärbung mit LeuM3/310 für einen Patienten mit AIDS gezeigt. Dieser

Patient hatte eine opportunistische Infektion mit *Pneumocystis carinii pneumoniae* und ein CD4/CD8 Ratio von 0.01. Wie in Abb. 8d gut zu erkennen ist besteht eine beträchtliche Verminderung der CD4⁺ Lymphozyten, während die Anzahl der CD4⁺ Monozyten nicht vermindert ist. Die Bestimmung des Prozentsatzes an positiven Zellen aus Abb. 8f ergab bei diesem Patienten mit AIDS 74.8% CD4 positive Monozyten.

Eine Zusammenfassung der Daten gibt Tabelle 6, wo die Anzahl der für die untersuchten Antigene positiven Monozyten angegeben ist. Bei 16 Patienten mit AIDS war die CD4 Expression auf durchschnittlich $59.2 \pm 14.4\%$ der Monozyten vorhanden. Bei den Patienten mit ARC wurden $64.1 \pm 10.3\%$ CD4⁺ Monozyten und bei den HIV seropositiven Hämophilen $56.7 \pm 10.6\%$ CD4⁺ Monozyten bestimmt. Im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen, bei denen im Falle der gesunden Normalspender $52.9 \pm 12.8\%$ CD4⁺ Monozyten und bei HIV seronegativen Hämophilen $52.0 \pm 15.7\%$ CD4⁺ Monozyten bestimmt wurden, zeigte sich folglich keine signifikante Alteration. Ein ähnliches Bild ergab sich bezüglich der Expression des Transferrin-Rezeptors, des Fc-Rezeptors und CD11 (C3bi-Rezeptor), wo zwischen Patientenkollektiven und Kontrollgruppen ebenfalls keine signifikanten Veränderungen entdeckt wurden. Auch bei der Expression von MHC class II Antigenen, die mit Hilfe von Antikörpern gegen die Genprodukte der drei bekannten MHC class II Subloci HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR bestimmt wurden, waren die Veränderungen in AIDS, ARC und HIV seropositiven Hämophilen nicht signifikant. So zeigten $84.3 \pm 12.2\%$ der Monozyten von Patienten mit AIDS eine Expression von HLA-DR auf ihrer Oberfläche und im

PATIENTS	N ¹	MONOCYTES POSITIVE FOR 2						
		CD 4	CD 11	IFR- RECEPTOR	FC- RECEPTOR	HLA-DP	HLA-DQ	HLA-DR
CONTROLS	10	52.9±12.8 (N=12)	89.8±3.5	81.4±11.1	78.8±10.4	77.1±11.1	19.7±11.1	89.8±6.3 (N=15)
HIV ⁻ HPH	8	52.0±15.7 (N=51)	90.7±3.6	86.2±9.1	87.8±6.1	79.6±8.6	14.5±14.5	85.4±6.6
HIV ⁺ HPH	8	56.7±10.6 (N=5)	89.3±5.9	83.3±10.8	87.6±7.1	78.6±9.2	22.7±21.2	88.0±5.3
ARC	6	64.1±10.3 (N=11)	91.1±5.0	81.3±10.5	84.8±8.0	69.1±13.0	15.2±13.5	91.5±5.6 (N=14)
AIDS	8	59.2±14.4 (N=16)	89.6±5.6	81.2±13.7	88.3±4.3	79.2±9.4	16.9±4.7	84.3±12.2 (N=19)

Tab.5: Oberflächenantigene auf LeuM3⁺ Monozyten: Prozentsatz an positiven Zellen.

- ¹ Anzahl der untersuchten Personen. In den Untersuchungen von CD4 und HLA-DR sind davon abweichende Populationsgrößen in Klammern unter dem jeweiligen Wert angegeben.
- ² Prozentsatz an positiven Zellen, mittels Analyse von LeuM3⁺ Zellen in einer Projektion der Gelbfluoreszenz sowie Subtraktion der Anfärbung mit einem irrelevanten Kontrollantikörper desselben Isotyps bestimmt.

Vergleich dazu $89.8 \pm 6.3\%$ der Monozyten von den gesunden Kontrollpersonen.

Da sich bezüglich der Anzahl an Monozyten, die die untersuchten Oberflächenantigene exprimieren, keine signifikanten Alterationen gezeigt hatten, wurde zusätzlich die Fluoreszenzintensität auf den für das betreffende Antigen positiven Monozyten untersucht, um auf diese Weise eine Aussage über die Anzahl der exprimierten Moleküle auf der Monozytenoberfläche machen zu können (Tab. 7). Bei der Analyse der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzsignale wird jeder analysierten Zelle in Abhängigkeit von der Intensität ihrer Anfärbung mit dem Fluoreszein-markierten Antikörper ein bestimmter Kanal zugeordnet. Die Fluoreszenzintensität ist in Tabelle 7 angegeben als mittlere Kanalzahl auf einer logarithmischen Skala mit 64 Kanälen und ist somit ein relatives Mass für die Expression eines bestimmten Antigens pro Zelle. Ein nur schwach exprimiertes Antigen wie z.B. CD4 hat folglich niedrige Werte der spezifischen Fluoreszenzintensität, während ein stark exprimiertes Antigen wie CD11 oder HLA-DR relativ hohe Werte zeigt. Bezüglich der Fluoreszenzintensität bei CD4 wurde 17.6 ± 4.1 bei AIDS, 20.8 ± 3.8 bei ARC und 22.9 ± 2.0 bei seropositiven Hämophilen bestimmt. Im Vergleich zur Fluoreszenzintensität 17.8 ± 3.9 von CD4⁺ Monozyten bei den Kontrollpersonen zeigte sich auch hier keine signifikante Veränderung. Hinsichtlich der spezifischen Fluoreszenzintensität bei den anderen untersuchten Antigenen waren konsistent bei allen Antigenen, einschliesslich der MHC class II Antigene HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR, keine signifikanten Alterationen zu beobachten. So

PATIENTS	N ¹	SPECIFIC FLUORESCENCE INTENSITY 2						
		CD 4	CD 11	TFR- RECEPTOR	FC- RECEPTOR	HLA-DP	HLA-DQ	HLA-DR
CONTROLS	10	17.8±3.9 (N=12)	38.6±4.0	26.3±3.3	26.1±2.9	29.4±4.5	21.6±3.1	34.4±4.6 (N=15)
HIV ⁻ HPH	8	23.2±3.2 (N=5)	39.4±3.0	29.3±6.2	31.6±3.8	30.7±2.4	23.5±3.3	35.2±4.5
HIV ⁺ HPH	8	22.9±2.0 (N=5)	39.8±4.7	28.5±5.4	32.3±2.7	30.9±2.9	25.3±2.6	37.2±3.7
ARC	6	20.8±3.8 (N=11)	40.1±2.9	26.4±4.4	30.6±4.3	29.2±4.9	22.3±2.7	36.9±3.6 (N=14)
AIDS	8	17.6±4.1 (N=16)	37.5±5.9	25.9±5.1	32.1±2.7	31.8±3.9	24.7±2.4	31.4±5.1 (N=19)

Tab.7: Oberflächenantigene auf LeuM3⁺ Monozyten: Spezifische Fluoreszenzintensität.

¹ Anzahl der untersuchten Personen. In den Untersuchungen von CD4 und HLA-DR sind davon abweichende Populationsgrößen in Klammern unter dem jeweiligen Wert angegeben.

² Spezifische Fluoreszenzintensität, angegeben als die errechnete mittlere Kanalzahl der für das jeweilige Antigen positiven Monozyten auf einer logarithmischen Skala mit einer Einteilung in 64 Kanäle, und somit ein relatives Maß für die Anzahl an exprimierten Molekülen pro Zelle.

wurde bei HLA-DR eine Fluoreszenzintensität von 31.4 ± 5.1 bei 19 Patienten mit AIDS und 34.4 ± 4.6 für 15 Kontrollpersonen bestimmt. Zusammenfassend lässt sich also konstatieren, dass die Expression der untersuchten Oberflächenantigene CD4, CD11, Fc-Receptor, Transferrin-Receptor, HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR auf frischen, unbehandelten Monozyten des peripheren Blutes sowohl hinsichtlich der Anzahl der Monozyten, die diese Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren, als auch bezüglich der Menge an exprimierten Molekülen pro Zelle bei den untersuchten Patientenkollektiven keine signifikante Veränderung zeigte.

3.3.2 Expression auf adhärennten Zellen

Heagy et al. (33) publizierten 1984 eine verminderte Expression von HLA-DR auf kulturierten, adhärennten Zellen bei Patienten mit AIDS. Da adhärennte Zellen aus Monozyten entstehen und als in-vitro Modell der Differenzierung von Blutmonozyten zu Gewebemakrophagen angesehen werden, standen die vorliegenden Ergebnisse einer unveränderten Expression der MHC class II Antigene auf frischen Monozyten (Tab.6 & 7) in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen von Heagy et al.. Um diesen Widerspruch genauer zu

PATIENTS	N	HLA-DR EXPRESSION	
		FRESH MONOCYTES	CULTURED MONOCYTES ¹
CONTROLS	3	88.7±6.1 ² (31.2±3.7) ³	66.2±20.3 (35.2±13.5)
AIDS	8	85.4±4.2 (29.7±6.4)	73.4±13.3 (40.5±6.1)

Tab.8: Expression von HLA-DR auf frischen und auf kulturierten, adhärennten Monozyten.

- ¹ Polymorphnukleäre Zellen wurden ohne Entfernung der nicht adhärennten Zellen drei Tage in Gegenwart von 100ng/ml LPS in Kultur gehalten und mittels 1mM EDTA von der Plastikoberfläche abgelöst.
- ² Prozentsatz an Monozyten, die HLA-DR auf der Zelloberfläche exprimieren.
- ³ Spezifische Fluoreszenzintensität, angegeben als die errechnete mittlere Kanalzahl der für das jeweilige Antigen positiven Monozyten auf einer logarithmischen Skala mit einer Einteilung in 64 Kanäle, und somit ein relatives Mass für die Anzahl an exprimierten Molekülen pro Zelle.

untersuchen und aufzuklären, ob sich nach der Reifung der Monozyten in vitro zu adhärenenten Zellen tatsächlich Unterschiede zwischen den Patienten mit AIDS und den gesunden Kontrollpersonen feststellen lassen, wurden die Zellen eines Teils der Patienten mit AIDS 3 Tage lang in Kultur genommen und danach bezüglich ihrer HLA-DR Expression untersucht. Bei diesen Experimenten wurden die nicht adhärenenten Zellen nicht entfernt und ausserdem exogen LPS in einer Konzentration von 100ng/ml zugegeben, um eine maximale Stimulation im Sättigungsbereich zu erreichen und auf diese Weise eine Modulation der HLA-DR Expression durch unterschiedliche Mengen an kontaminierenden, exogen stimulierenden Substanzen möglichst auszuschliessen. In den auf diese Weise durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine leichte Zunahme der spezifischen Fluoreszenzintensität bei adhärenenten Zellen im Vergleich zu frischen Monozyten, jedoch war diese Zunahme bei Patienten mit AIDS und gesunden Kontrollspendern vergleichbar (Tab. 8). Die Anzahl der HLA-DR⁺ Monozyten nahm während der Kultur ab, jedoch zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. So verminderte sich bei den Patienten mit AIDS durch die dreitägige Kultur die Anzahl der HLA-DR⁺ Monozyten von $85.4 \pm 4.25\%$ auf $73.4 \pm 13.3\%$ und bei den Kontrollpersonen von $88.7 \pm 6.1\%$ vor der Kultur auf $66.2 \pm 20.3\%$ nach der Kultur. Insgesamt zeigten sich also auch bei adhärenenten Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Expression des MHC class II Antigens HLA-DR zwischen Patienten mit AIDS und Kontrollen.

3.4 Untersuchung der α TNF-Produktion von Monozyten

3.4.1 In vitro Stimulation von Monozyten mit LPS

Findet die Isolation der polymorphnukleären Zellen streng pyrogenfrei statt und werden die so gewonnenen PBM als Effektorzellen gegenüber Actinomycin D vorbehandelten WEHI 164 Targetzellen in einem ^{51}Cr -Release-Test verwendet, so findet man nur eine sehr geringe spontane Lyse von Targetzellen mittels

Materialien	LAL-Test ¹ (33pg/ml)	TNF-Test ² (1pg/ml)
FCS Interchem B4	-	-
FCS Gibco	-	+
FCS Flow	-	(-)
PBS ³	-	n.d.
RPMI 1640 ³	-	-
Costar 96-well-Mikrotiterplatte	-	-
Titertek 96-well-Mikrotiterplatte	+	n.d.
Nunc 96-well-Mikrotiterplatte	+	n.d.
Ratiolab Pipettenspitzen	-	-
Glasflaschen autoclaviert (134°C, 20min)	+	n.d.
Glasflaschen hitzebehandelt (180°C, 4h)	-	-

Tab.9: Pyrogenhaltigkeit von verschiedenen Materialien.

- ¹ basiert auf der Gelbildung eines Amöbozyten-Lysats in Kontakt mit LPS. Die verwendete Charge des käuflichen Tests besaß die in Klammern angegebene Empfindlichkeit.
- ² basiert auf der TNF-Produktion von Monozyten bei Inkubation mit LPS-haltigen Materialien. Die in Klammern angegebene Empfindlichkeit dieses Tests war bedeutend höher als die des LAL-Tests, mit der Folge dass einige Materialien, die im LAL-Test noch als pyrogenfrei getestet wurden, im TNF-Test zum Teil bereits als pyrogenhaltig eingestuft worden sind.
- ³ PBS und RPMI 1640 wurden von der Apotheke der Med. Poliklinik Innenstadt, München hergestellt.

Effektorzellen. Werden die in diesem Testsystem als Effektorzellen fungierenden Monozyten jedoch mittels exogener LPS-Zugabe in vitro stimuliert, so nimmt die Lyse von Targetzellen um ein Vielfaches zu (siehe Abb.10). Zur Bestimmung der basalen Zytotoxizität unstimulierter Monozyten war es folglich erforderlich, in einem pyrogenfreien Testsystem zu arbeiten. Dazu mussten sämtliche Materialien, mit denen die Zellen von der Blutabnahme bis zum Einsatz im Testsystem in Kontakt kamen, auf ihre Pyrogenhaltigkeit geprüft werden. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von verschiedenen Materialien mittels zweier Testsysteme mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Der LAL-Test ist ein käuflicher Test und beruht auf einer Gelbildung eines Amöbozyten-Lysats in Kontakt mit LPS. Wesentlich empfindlicher ist der α TNF-Test, der auf einer α TNF-Freisetzung durch Monozyten bei Inkubation mit dem LPS-haltigen Material basiert. Es zeigte sich, dass sterile Einwegmaterialien aus Kunststoffen im allgemeinen pyrogenfrei sind, während Materialien aus Glas, die mehrmals verwendet wurden, häufig LPS enthalten.

3.4.2 Zellfreier Test

Eine Abwandlung des in Material und Methoden beschriebenen Tests mit WEHI 164 Zellen besteht darin, nicht die Effektorzellen selbst mit den Targetzellen zu inkubieren, sondern die Überstände von Zellen, die 4 Stunden im Brutschrank zusammen mit LPS inkubiert worden waren, in einem ansonsten identischen Test einzusetzen. Vorteil eines solchen Testes ist, dass nach der LPS-Stimulation der Effektorzellen im Brutschrank mit den Überständen

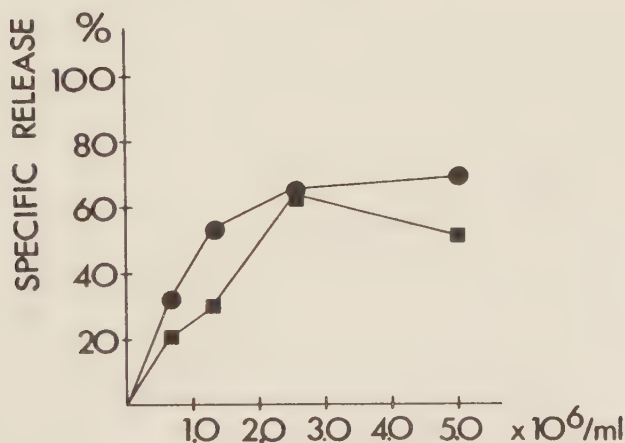


Abb.9: Abhängigkeit der α TNF-Produktion von der Zellkonzentration. PBM von zwei Normal Spendern wurden in unterschiedlichen Zellkonzentrationen zusammen mit einer definierten Menge von exogenem LPS 4h bei 37° im Brutschrank inkubiert und die Überstände der Zellen in einem ^{51}Cr -Release-Test mit WEHI 164 Act.D Targetzellen eingesetzt. Die Abbildung zeigt bei beiden Normal Spendern eine Sättigungskurve, deren Sättigungsbereich ab etwa 4 Mio Zellen/ml beginnt.

nicht mehr pyrogenfrei gearbeitet werden muss. Die Menge des von den LPS-stimulierten Zellen in den Überstand abgegebenen α TNF ist sowohl von Dosis und Zeit als auch von der Zellzahl abhängig. Um herauszufinden, ob diese Variante des Tests mit den uns zur Verfügung stehenden Zellzahlen möglich ist, wurde die Abhängigkeit der α TNF-Produktion von der Zellkonzentration ermittelt (Abb. 9). Man erkennt, dass sich die α TNF-Produktion ab einer gewissen Zellkonzentration in einem Sättigungsbereich befindet. Da von jedem Patienten aufgrund des häufig schlechten klinischen Zustands nur 40ml Blut abgenommen werden konnten und ausserdem zumeist eine Leukopenie herrschte, war pro Patient häufig nur eine geringe Zellzahl vorhanden, so dass die Option eines zellfreien Tests fallengelassen wurde.

3.5 α TNF-Produktion bei Patienten mit HIV-Infektion

Die α TNF-Produktion von Monozyten des peripheren Blutes wurde ohne und mit LPS-Stimulation der Monozyten in einem ^{51}Cr -Release-Test mit WEHI 164 Act.D Targetzellen bestimmt. Die Abbildung 10 zeigt die α TNF-Produktion des bereits in Abb. 8 gezeigten Patienten mit AIDS und einer gesunden Kontrollperson jeweils mit (—○—) und ohne (o---o) LPS-Stimulation. Während die Zytotoxizität ohne LPS-Stimulation sowohl bei dem Patienten als auch der Kontrollperson sehr niedrig ist, steigt sie nach der Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ LPS bei Beiden um ein Vielfaches an.

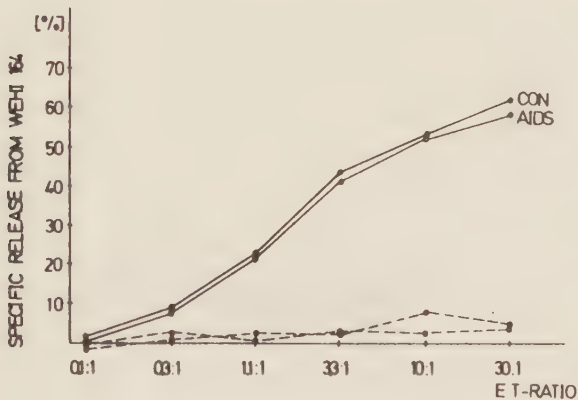


Abb.10: Spezifische ^{51}Cr -Freisetzung in einem ^{51}Cr -Release-Assay bei einem Patienten mit AIDS und einer gesunden Kontrollperson ohne und mit Stimulation der Monozyten mit exogenem LPS. Die spezifische ^{51}Cr -Freisetzung im WEHI 164 Act.D ^{51}Cr -Release-Test ist ein relatives Mass für die α TNF-Produktion der Monozyten und ist in Abhängigkeit vom Effektor- zu Targetzellverhältnis für unstimulierte Zellen (o---o) und LPS-stimulierte (—○—) angegeben. Während die α TNF-Produktion bei Zellen ohne Stimulation sowohl bei dem Patienten mit AIDS (identisch mit dem in Abb.7 gezeigten Patienten) als auch bei der gesunden Kontrollperson sehr niedrig ist, steigt sie nach der Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ LPS bei beiden beträchtlich an.

Die spezifische ^{51}Cr -Freisetzung bei einem E:T Ratio von 3.3:1 war bei dem gezeigten Patienten mit AIDS 41% und der Kontrollperson 43%. Bei einer Gruppe von 8 Patienten mit AIDS wurde beim gleichen E:T-Ratio von 3.3:1 ohne LPS-Stimulation eine spezifische ^{51}Cr -Freisetzung von $11.6 \pm 12.6\%$ und mit LPS-Stimulation von $34.1 \pm 16.8\%$ gefunden. Im Vergleich dazu wurden bei 8 gesunden Kontrollpersonen $5.3 \pm 4.0\%$ spezifische ^{51}Cr -Freisetzung ohne und $22.0 \pm 13.4\%$ mit LPS-Stimulation bestimmt. Um die Daten der verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können wurde die Tag-zu-Tag-Variabilität mittels eines bei

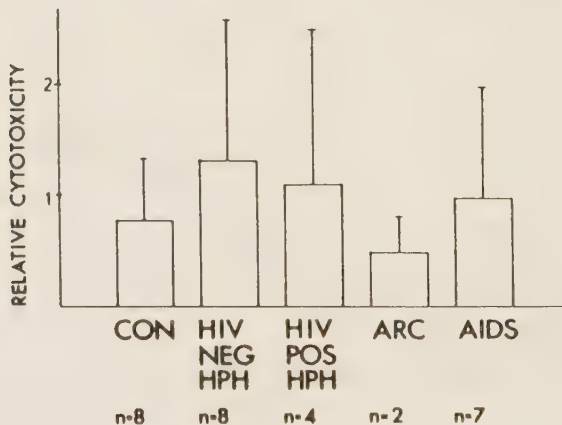


Abb.11: TNF-Produktion von Monozyten bei den untersuchten Patientenkollektiven. Die relative Zytotoxizität in einem ^{51}Cr -Release-Assay mit WEHI 164 Act.D Targetzellen wurde mittels eines bei jedem Experiment wiederholten Standards bestimmt. Die statistische Analyse der gewonnenen Daten konnte bei keiner der untersuchten Patientengruppen eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe feststellen.

jedem Experiment mitlaufenden Standards elimiert. Die Mittelwerte der Quotienten aus dem Patientenwert und dem Standardwert sind in Abbildung 11 für die unterschiedlichen Patientenkollektive gezeigt. Die statistische Analyse der so gewonnenen Daten konnte für keine der angegebenen Patientengruppen eine signifikante Veränderung aufzeigen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten also trotz schweren immunologischen Defekten der Lymphozyten bei den untersuchten Patienten (Kap. 3.1) keine Beeinträchtigung der Monozyten bezüglich ihrer Fähigkeit zur α TNF-Produktion.

3.5.1 Neutralisationsexperimente mit MAB gegen α TNF

Aktivierte T- und B-Lymphozyten können ein dem α TNF verwandtes Molekül, das Lymphotoxin oder β TNF, produzieren und dieses kann ebenfalls im WEHI 164/Act.D Test gemessen werden. Um zu belegen, dass auch bei den Patienten tatsächlich das Monozytenprodukt α TNF für die gemessene Zytotoxizität verantwortlich ist, wurden Neutralisationsexperimente mit einem spezifischen monoklonalen anti- α TNF Antikörper (195/8) durchgeführt. Es zeigte sich, dass

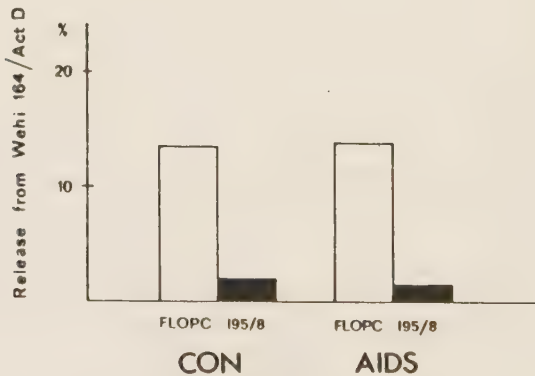


Abb.12: Neutralisation von α TNF im Überstand LPS-stimulierter Monozyten durch einen anti- α TNF Antikörper (195/8) bei 2 Patienten mit AIDS und 2 Kontrollpersonen. Auf der linken Seite ist die ^{51}Cr -Freisetzung bei Inkubation mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (FLOPC) angegeben, rechts nach der Inkubation mit dem gegen α TNF gerichteten Antikörper (195/8). Man erkennt, dass sowohl bei den beiden Patienten als auch bei den Kontrollpersonen nach der Inkubation mit dem gegen α TNF gerichteten Antikörper die ^{51}Cr -Freisetzung auf sehr niedrige Werte zurückgeht, während bei der Inkubation mit dem irrelevanten Kontrollantikörper bei beiden Gruppen die ^{51}Cr -Freisetzung relativ hoch ist.

sowohl bei den Kontrollpersonen als auch bei AIDS-Patienten nach Zugabe des MAB eine vollständige Reduktion der Zytotoxizität erzielt werden konnte (Abb.12). Somit konnte demonstriert werden, dass bei AIDS-Patienten wie bei Gesunden das von Monozyten gebildete α TNF der Hauptmediator der Zytotoxizität ist und dass die α TNF Produktion der Monozyten von AIDS-Patienten vergleichbar ist mit der von Normalpersonen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von funktionell wichtigen Oberflächenantigenen bei Patienten mit AIDS, ARC, HIV seropositiven und HIV seronegativen Hämophilen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern untersucht. Diese binden jedoch nicht nur spezifisch an die Oberfläche von Zellen, sondern können als Immunglobuline auch unspezifisch gebunden werden. Die unspezifische Bindung ist besonders bei Monozyten recht ausgeprägt, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass sie eine grössere Anzahl an Fc-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche exprimieren (45,77,79), an die die Antikörper mit ihrem Fc-Teil gebunden werden. Da diese unspezifische Bindung bei der Bestimmung der gebundenen Antikörper falsch hohe Werte verursacht, wird eine exakte Analyse der exprimierten Oberflächenantigene verhindert. Bei schwach exprimierten Antigenen wie z.B. CD4 wirkt sich die unspezifische Bindung von Antikörpern als Fehlerquelle besonders stark aus und ist folglich ausgesprochen unerwünscht. Deshalb wurde versucht, diese unspezifische Bindung möglichst vollständig zu unterbinden und eine Strategie entwickelt, die dies weitgehend möglich macht. Vor der Behandlung mit den spezifischen Antikörpern wurden die zu untersuchenden Zellen mit Oligomeren von hitzeaggregiertem IgG inkubiert, wodurch die unspezifischen Bindungsstellen zum grössten Teil abgesättigt wurden und die nachfolgend zugegebenen spezifischen Antikörper nicht mehr unspezifisch gebunden werden konnten. Ausserdem wurden bei jedem

Patienten mehrere irrelevante Antikörper (i.e. Antikörper, die nicht gegen ein bekanntes Epitop gerichtet sind) mit unterschiedlichem Isotyp eingesetzt und durch Vergleich mit der Bindung der spezifischen Antikörper die spezifische Anfärbung bestimmt. Auf diese Weise wurde versucht, den systematischen Fehler der unspezifischen Bindung möglichst niedrig zu halten.

Die Expression des CD4 Moleküls ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit AIDS, weil das CD4 Molekül als putativer Rezeptor für das HIV Virus angesehen wird. In den oben aufgeführten Untersuchungen zeigte sich trotz einer starken Verminderung der CD4⁺ T-Lymphozyten bei den Patienten mit AIDS keine Verminderung der Expression von CD4 bei den Monozyten dieser Patienten. Die Expression von CD4 auf Monozyten in Patienten mit AIDS wurde inzwischen auch von Rieber et al. (64) mittels einer Rosettierung mit Rindererythrozyten untersucht. Obwohl in diesen Untersuchungen derselbe Antikörper 310 gegen CD4 verwendet wurde, stellte diese Arbeitsgruppe eine verminderte Expression von CD4 fest. Die Diskrepanz in den Ergebnissen zwischen den beiden verwendeten Methoden Immunfluoreszenz und Erythrozytenrosettierung ist aufgrund der Schwierigkeiten beim Nachweis und bei der Quantifizierung der CD4-Expression erklärbar. Diese Schwierigkeiten resultieren daraus, dass einerseits die Expression von CD4 auf Monozyten sehr schwach ist, und andererseits gerade Monozyten eine sehr hohe unspezifische Bindung von Antikörpern zeigen, so dass eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung oft schwierig

ist. Um diese Schwierigkeiten zu Überwinden wurde in der vorliegenden Arbeit auf der einen Seite versucht, die schwache Expression von CD4 mit einer möglichst sensitiven Methode zu untersuchen, die auch eine geringe Anzahl an exprimierten Molekülen auf der Zelloberfläche entdeckt, und auf der anderen Seite die unspezifische Bindung möglichst weitgehend zu unterdrücken bzw. zu kontrollieren. Die angewandte Methode mit Einsatz eines biotinylierten Antikörpers und der konsekutiven Anfärbung mit Avidin-Phycoerythrin erwies sich als ausgesprochen sensibel, so dass dieser Methode der Vorzug vor einer direkten Immunfluoreszenz mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper gegeben wurde. Die Sensitivität dieser Methode zeigt sich unter anderem auch dadurch, dass mit ihrer Hilfe die Expression des IL2-Rezeptors auf unstimulierten Monozyten des peripheren Blutes nachgewiesen werden konnte, was bisher nur auf stimulierten Monozyten gelang (34), wo die Expression gegenüber unstimulierten Monozyten wesentlich höher ist. Die verwendete Doppelmarker-Immunfluoreszenz machte es möglich, Monozyten ohne vorherigen Aufreinigungs- bzw. Separationsschritt innerhalb der Gesamtpopulation der polymorphnukleären Zellen sicher zu identifizieren und schliesst damit Fehlerquellen aus, die sich während solcher Aufreinigungsschritte immer einstellen können. Ausserdem sind die Alterationen der Zellen während einer Immunfluoreszenz nach dem beschriebenen Schema relativ gering, da alle Schritte direkt hintereinander und ohne Übernachtinkubationen durchgeführt werden und die Zellen nicht mit Reagenzien in Kontakt kommen, die die Zelloberfläche verändern können. Die unspezifische Bindung wurde

mit Hilfe der oben diskutierten Vorinkubation mit aggIgG und der Verwendung von Isotyp-Kontrollantikörpern weitgehend eliminiert. Um aufzuzeigen, dass das Ergebnis unabhängig von dem für den Isotyp IgG1 verwendeten Kontrollantikörper MOPC 21 ist, wurden vom Isotyp IgG1 zwei weitere Kontrollantikörper 4.11 und 6.1 verwendet, mit denen sich die erhaltenen Ergebnisse bestätigten. Da die Diskrepanz zwischen den Resultaten der beiden Methoden Immunfluoreszenz und Erythrozytenrosettierung nicht aufgelöst werden konnte, steht eine Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen noch aus.

Ausser der CD4-Expression wurden in der vorliegenden Arbeit unter anderem auch die Oberflächenantigene CD11 (C3bi-Rezeptor), Fc-Rezeptor und Transferrin-Rezeptor untersucht. Der Rezeptor für C3bi und der Fc-Rezeptor könnten einen möglichen Weg darstellen, wie das von Antikörpern und Komplement bedeckte Virus in die Monozyten gelangt. Interessanterweise ist der Rezeptor für C3b (CR I) auf Erythrozyten bei Patienten mit AIDS vermindert exprimiert (36). Ob diese Verminderung in vivo eine Konsequenz für den Ablauf einer adäquaten Immunantwort hat, ist bisher nicht bekannt. Man weiss jedoch, dass CR I auch bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses vermindert auf Erythrozyten exprimiert wird, bei dem ebenfalls eine gestörte Immunantwort vorliegt.

Zu Beginn der Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit gab es mehrere Hinweise, die auf eine veränderte Expression des Fc-Rezeptors hindeuteten. Die Expression des Fc-Rezeptors wird auf Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie unter

anderem durch γ -Interferon (IFN) beeinflusst (30,56,82). Da die Produktion von γ -IFN und anderen Leukokinen bei AIDS gestört ist (53), könnte dies einen Einfluss auf die Expression des Fc-Rezeptors bei Monozyten in Patienten mit AIDS haben. Einen weiteren Hinweis darauf, dass auf Monozyten von Patienten mit AIDS möglicherweise eine veränderte Expression des Fc-Rezeptors vorliegen könnte, lieferten Prince et al. (62), die eine verminderte Funktionsfähigkeit von Monozyten als antigen-präsentierenden Zellen veröffentlichten. Da ein Zusammenhang zwischen der Expression von Fc-Rezeptoren und der Fähigkeit zur Antigenpräsentation bekannt ist (77,90), könnte eine verminderte Fähigkeit zur Antigenpräsentation mit einer Veränderung der Expression des Fc-Rezeptors einhergehen. Trotz dieser Hinweise zeigte sich in den durchgeführten Experimenten keine veränderte Expression des Fc-Rezeptors im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

Der Rezeptor für Transferrin wird als ein Differenzierungs- und Reifungsantigen auf Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie angesehen (4) und wird auch auf aktivierten Makrophagen verstärkt exprimiert (32). Um die Spezifität des verwendeten monoklonalen Antikörpers 2-17 gegen den Transferrin-Rezeptor zu kontrollieren wurden Inhibitionsexperimente gemacht mit biotinyliertem MAB 2-17 und vorheriger Inkubation mit entweder unbiotinyliertem MAB 2-17 oder einem Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps. Während die Bindung des biotinylierten Antikörpers fast komplett durch den nicht biotinylierten Antikörper inhibiert werden konnte, zeigte sich keine Verminderung nach Vorinkubation mit dem irrelevanten

Antikörper des gleichen Isotyps (Stachel et al.; unveröffentlicht). Bei der vorliegenden Untersuchung der Expression des Transferrinrezeptors auf Monozyten von Patienten mit AIDS und ARC zeigten sich wie schon bezüglich des Fc-Rezeptors und des C3bi-Rezeptors keine signifikanten Veränderungen gegenüber gesunden Kontrollpersonen.

Die Expression von MHC class II Histokompatibilitätsantigenen spielt eine wichtige Rolle in der Funktion von Monozyten/Makrophagen als akzessorischen Zellen (8,20,89), und besonders HLA-DR⁺/HLA-DQ⁺ Monozyten besitzen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentation in einer autologen Mixed-Lymphocyte-Reaction (27,78). Deshalb könnte eine Verminderung der MHC class II Antigene möglicherweise schwere Veränderungen der Immunantwort in vivo hervorrufen. Andererseits war bisher keine Krankheit bekannt, bei der es zu einer Verminderung der Expression von MHC class II Antigenen auf Monozyten kommt. Belsito et al. (7) konnten eine verminderte Expression von MHC class II Antigenen auf Langerhans Zellen, die in der Haut die Aufgabe der Antigenpräsentation besitzen, bei Patienten mit AIDS nachweisen. Da die Infektion von peripheren Blutmonozyten, die von Ho et al. (35) und Gartner et al. (22) aufgezeigt wurde, ebenfalls zu einer veränderten Expression von MHC class II Histokompatibilitätsantigenen führen könnte und diese besonders schwerwiegende Folgen bezüglich der Funktion der Monozyten als antigenpräsentierenden Zellen hätte, wurden die Genprodukte der drei bekannten MHC class II Subloci HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR genauer untersucht. Die durchgeführten Experimente gaben jedoch

keine Anhaltspunkte dafür, dass eine Veränderung dieser drei Oberflächenantigene bei Patienten mit AIDS besteht. Heagy et al. (33) berichteten eine verminderte Expression von HLA-DR auf adhärennten Zellen, die sich 3 Tage in Kultur befanden. Werden Monozyten mehrere Tage ohne exogene Stimulation in Kultur gehalten, so zeigt sich eine Verminderung der Expression von MHC class II Antigenen (55,76). Im Gegensatz dazu führt die Stimulation mit γ -IFN zu einer vermehrten Expression von HLA-DQ und HLA-DR (1,6,37) auf Monozyten und die Stimulation mit LPS führt zu einer Steigerung der Menge an exprimierten HLA-DR Molekülen pro Monozyt (80). In Anbetracht der Tatsache, dass es ausgesprochen schwierig ist, hochreine Monozytenkulturen ohne verunreinigende Lymphozyten herzustellen, kann praktisch nie völlig ausgeschlossen werden, dass in den so hergestellten Kulturen Reste von γ -IFN und anderen Lymphokinen vorhanden sind. Da aber bereits geringe Konzentrationen von γ -Interferon zu einer Steigerung der Expression von MHC class II Antigenen führen (6,28), werden auf diese Weise leicht Veränderungen herbeigeführt, die in vivo nicht existent sind. Ein solches Testsystem eignet sich deshalb nur bedingt und mit Vorbehalten, um die Expression von MHC class II Antigenen auf der Monozytenoberfläche zu untersuchen. Todd et al. (80) konnten zeigen, dass auch die Stimulation mit LPS zu einer Modulation der HLA-DR Expression führt. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz bei frischen Zellen, wo weder steril noch pyrogenfrei gearbeitet werden muss, muss folglich bei der Untersuchung von MHC class II Antigenen auf kultivierten Monozyten entweder streng pyrogenfrei gearbeitet

werden oder aber eine für alle untersuchten Zellen gleiche Stimulation mit exogenem LPS im Sättigungsbereich stattfinden. Wird dies nicht durchgeführt, so erhält man möglicherweise durch unterschiedliche Mengen an kontaminierendem LPS eine unterschiedlich hohe Stimulation und damit Expression der MHC class II Antigene. Da üblicherweise bei Zellkulturen nicht völlig pyrogenfrei gearbeitet wird und andererseits von Heagy et al. eine Kontrolle der LPS-Haltigkeit der verwendeten Materialien nicht angeführt wird, ist es in den durchgeführten Experimenten möglicherweise dadurch zu den Unterschieden gekommen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Untersuchung von MHC class II Antigenen auf kultivierten Monozyten ausgesprochen problematisch ist und Ergebnisse aus solchen Experimenten mit Vorsicht zu diskutieren sind. In Anbetracht der Tatsache, dass ein vollständiger Ausschluss einer exogenen Stimulation praktisch unmöglich ist, da man dazu in der Kultur einen Reinheitsgrad von 100% adhären Zellen haben müsste, wurde in der vorliegenden Arbeit die Strategie verfolgt sowohl bezüglich der Stimulation durch Lymphozyten bzw. deren Mediatormoleküle als auch bezüglich der Stimulation durch exogenes LPS im Sättigungsbereich zu arbeiten. Dies wurde in den durchgeführten Experimenten dadurch erreicht, dass die Lymphozyten des Spenders in der Kultur belassen wurden und das verwendete Kulturmedium LPS im Sättigungsbereich enthielt. Anhand der so gewonnenen Ergebnisse konnten auch bei adhären Zellen von Patienten mit AIDS keine Veränderungen in der HLA-DR Expression festgestellt werden. Dies wurde durch eine kürzlich erschienene Arbeit von Sei et. al.

(71) bestätigt, in der ebenfalls keine Veränderungen in der Expression der MHC class II Antigene bei Monozyten des peripheren Blutes bei AIDS-Patienten festgestellt werden konnten.

Da sich hinsichtlich der exprimierten Oberflächenantigene keine Alterationen gezeigt hatten, wurden die Monozyten von Patienten mit AIDS bezüglich ihrer Funktionsfähigkeit untersucht. Dazu wurde die Maus Fibrosarkom Zelllinie WEHI 164 zur Bestimmung der α TNF-Produktion mit und ohne LPS-Stimulation herangezogen. Untersuchungen hatten gezeigt, dass die mit Actinomycin D behandelten WEHI 164 Zellen nur von Monozyten, nicht jedoch von NK-Zellen lysiert werden können (68,92), und dass dies mittels des Mediatormoleküls α TNF geschieht (91). Die α TNF-Produktion von unstimulierten Monozyten ist sehr gering und lässt sich durch Zugabe von exogenem LPS (13,91), γ -IFN und IL1 (57) beträchtlich steigern. Die WEHI 164 Zelllinie ist inzwischen in vielen Labors etabliert und findet als Testsystem zur Bestimmung der Zytotoxizität von Monozyten des peripheren Blutes Anwendung (15,49,58). Sie wurde unter anderem auch von Poli et al. (60) verwendet, um die Funktionsfähigkeit von Monozyten bei einer Gruppe von Patienten mit ARC zu bestimmen. In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht die Stimulationsfähigkeit durch LPS-Zugabe geprüft, sondern lediglich die Basalaktivität ohne Stimulation bestimmt. Ähnlich der vorliegenden Untersuchung konnten auch Poli et al. keine Veränderungen bezüglich der basalen Monozyten-Zytotoxizität bei diesem Patientenkollektiv finden. Aufgrund der oben dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl die α TNF-Produktion von

unstimulierten, als auch von stimulierten Monozyten bei Patienten mit AIDS, ARC, HIV seropositiven und seronegativen Hämophilen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen unverändert ist. Es konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen AIDS-Patienten mit Kaposi Sarkom und solchen mit opportunistischen Infektionen hinsichtlich der α TNF-Produktion festgestellt werden. Wahrscheinlich spielen andere, möglicherweise multiple Faktoren eine wichtigere Rolle für die Entwicklung eines Kaposi Sarkoms. In einem anderen Testsystem zur Bestimmung der Zytotoxizität von Monozyten, in dem vermutlich Il1 das Mediatormolekül darstellt, und bei dem A375 Melanomzellen in einem Langzeitversuch als Targetzellen verwendet werden, konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Patienten mit AIDS und Kontrollpersonen festgestellt werden (39). Untersuchungen von Alveolarmakrophagen, als deren Precursorzellen Blutmonozyten angenommen werden, bezüglich der Fähigkeit, die intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* und *Chlamydia psittaci* zu lysieren, zeigten bei Patienten mit AIDS normale Werte (52). Insgesamt zeigten also die vorliegenden Untersuchungen, wie schon die Arbeiten von Kleiner mann et al. (39), Murray et al. (52) und Poli et al.(60), eine weitgehend normale Funktionsfähigkeit von Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie bezüglich der untersuchten Funktionen.

Auf der anderen Seite konnten inzwischen auch mehrere Arbeitsgruppen phänotypische und funktionelle Veränderungen von Monozyten bei AIDS feststellen. So zeigten Smith et al.(74), dass die Fähigkeit von Monozyten zur Chemotaxis bei AIDS vermindert ist , und Pinching et al. (58) konnten eine reduzierte Fc-

Rezeptor abhängige Phagozytose von Monozyten bei 2 Homosexuellen mit Kaposi Sarkom nachweisen. Die Untersuchungen von Prince et al. (62) ergaben eine verminderte Funktionsfähigkeit von Monozyten, mittels gebundener Antikörper gegen CD3 zu einer T-Zell Proliferation zu führen. Da in diesen Untersuchungen keine aufgereinigten Monozytenpopulationen verwendet wurden, könnte der beobachtete Befund auch auf eine T-Zell Insuffizienz zurückzuführen sein. Bei den im Rahmen der vorliegenden Dissertation gemachten Experimenten (Kap. 3.2.1) zeigte sich hinsichtlich der Bindung von Maus Immunglobulin des Isotyps IgG1 ein Polymorphismus sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten. Dieses Phänomen wurde bereits vorher von einigen Autoren beschrieben (45,77). Da bei den von Prince et al. durchgeführten Versuchen ein monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG1 verwendet wurde, dessen Bindung an die Monozyten jedoch nicht kontrolliert wurde, ist in Anbetracht des relativ kleinen Patientenkollektivs auch ein Fehler, der durch diesen Polymorphismus verursacht wurde, nicht auszuschliessen.

Fasst man die gewonnenen Erkenntnisse über Monozyten bei AIDS schliesslich zusammen, so sind einige der Funktionen von Monozyten offensichtlich defekt, während andere wie die in dieser Arbeit gezeigte Fähigkeit zur α TNF-Produktion wiederum unbeeinflusst bleiben. Insgesamt also scheinen diese Zellen relativ resistent gegenüber der HIV-Infektion zu sein, obwohl inzwischen das Virus aus Monozyten von Patienten mit AIDS isoliert werden konnte (22,35), so dass eine direkte Beteiligung

an der Infektion durch HIV anzunehmen ist.

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch Gewebsmakrophagen offensichtlich direkt von HIV (31,69) infiziert werden können.

Mit den vorliegenden Daten zur Expression von Oberflächenantigenen und der Fähigkeit zur α TNF-Produktion konnte die These unterstützt werden, dass Monozyten trotz der Expression von CD4 als putativem Virusrezeptor und trotz möglicher direkter Infektion von Monozyten durch HIV durchaus nicht vollständig alteriert und funktionsunfähig sind, sondern dass die Veränderungen diskret sind und auf einzelne Funktionen beschränkt bleiben. Ausserdem konnte mit Hilfe der Bestimmung des CD4/CD8-Ratios und der Mitogenstimulation gezeigt werden, dass bei genau denselben Patienten, die bezüglich Oberflächenantigenen und α TNF-Produktion keine Veränderungen zeigten, schwerwiegende Veränderungen bei den immunologischen Parametern bestehen, die auf Lymphozyten und deren Funktionsfähigkeit basieren. Die vorliegende Untersuchung untermauert somit die These einer relativen Resistenz von Monozyten bzw. Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie gegenüber Veränderungen im Rahmen einer HIV-Infektion und lässt infolgedessen eine genauere Untersuchung, welche intrazellulären Mechanismen diese relative Resistenz verursachen, und ob diese offensichtlich zumindest für die eigentliche Zelle effizienten Abwehrmechanismen möglicherweise exogen gesteigert werden können, als sinnvoll erscheinen.

5. Zusammenfassung

Da das CD4 Molekül, welches als Virusrezeptor der infizierten T-Helferzellen bei der HIV-Infektion angesehen wird, auch auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert wird, und da Monozyten auch tatsächlich von HIV in-vitro infiziert werden können, wurden in den vorliegenden Untersuchungen die Monozyten von Patienten mit AIDS, ARC, HIV seropositiven und HIV seronegativen Hämophilen auf die Expression von CD4 und anderen funktionell wichtigen Oberflächenantigenen wie C3bi-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor, Fc-Rezeptor und die drei MHC class II Antigene HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR untersucht. Die Expression dieser Oberflächenantigene wurde mittels einer Doppelmarker-Immunfluoreszenz bestimmt, bei der der MAB LeuM3-FITC mit grünem Fluoreszenzsignal zur Identifikation der Monozyten verwendet wurde, während die anderen exprimierten Oberflächenantigene mittels biotinylierter MAB und Anfärbung mit dem gelben Fluoreszenz-Farbstoff Phycoerythrin analysiert wurden. Sowohl bezüglich der Anzahl der positiven Zellen als auch bezüglich der Menge an exprimierten Molekülen pro Zelle konnte für CD4 und für alle anderen untersuchten Oberflächenantigene kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen den Patientenkollektiven und der Kontrollgruppe. So war der Anteil der CD4⁺ Monozyten bei 16 Patienten mit AIDS $59.2 \pm 14.45\%$ und $64.1 \pm 10.3\%$ bei 11 Patienten mit ARC, im Vergleich zu $52.9 \pm 12.8\%$ bei 12 gesunden Kontrollpersonen. Die Expression von MHC class II Antigenen wurde auch auf kultivierten Monozyten untersucht und zeigte hier wie auch schon bei den frischen Zellen keine

Veränderung gegenüber Kontrollpersonen.

Um Monozyten auch bezüglich ihrer Funktionsfähigkeit zu untersuchen, wurde die Fähigkeit zur α TNF-Produktion mit Hilfe der Maus-Fibrosarkom-Zelllinie WEHI 164 in einem ^{51}Cr -Release-Test bestimmt. Obwohl die untersuchten Patienten mit AIDS schwerwiegende Alterationen immunologischer Parameter des Lymphozytensystems wie eine signifikante Verminderung von CD4^+ Lymphozyten im peripheren Blut und eine stark reduzierte Stimulierbarkeit durch Mitogene zeigten, wurde bezüglich der α TNF-Produktion von Monozyten ohne und mit LPS-Stimulation keine Veränderung festgestellt.

Mit den vorliegenden Daten konnte die These untermauert werden, dass die Veränderungen von Monozyten bei der HIV-Infektion diskret und auf einzelne Bereiche beschränkt sind, so dass eine relative Resistenz von Monozyten gegenüber HIV angenommen werden muss. Dies lässt therapeutische Strategien, welche eine Steigerung der Monozytenaktivität zum Ziel haben, als sinnvoll erscheinen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ameglio, F., M.R. Capobianchi, A. Dolei, and R. Tosi. 1983. Differential effects of gamma interferon on expression of HLA class II molecules controlled by the DR and DC loci. *Infect.Immun.* 42:122.
2. Amman, A.J., D. Abrams, M. Conant, D. Chudwin, M. Cowan, P. Volberding, B. Lewis, and C. Casavant. 1983. Acquired immune dysfunction in homosexual men: immunologic profiles. *Clin.Immunol.Immunopath.* 27:315.
3. Amman, A.J., G. Schiffman, D. Abrams, P. Volberding, J. Ziegler, and M. Conant. 1984. B-cell immunodeficiency in AIDS. *J.Am.Med.Assoc.* 251:1447.
4. Andreessen, R., J. Osterholz, H. Bodemann, K.J. Bross, U. Costabel, and G.W. Löhr. 1984. Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human monocytes. *Blut* 49:195.
5. Ashwood-Smith, M.J. 1964. Low temperature preservation of mouse lymphocytes with dimethyl sulfoxide. *Blood* 23:494.
6. Basham, T.Y., and T.C. Merigan. 1983. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J.Immunol.* 130:1492.
7. Belsito, D.V., M.R. Sanchez, R.L. Baer, F. Valentine, and G.J. Thorbecker. 1984. Reduced Langerhans cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N.Engl.J.Med.* 310:1279.
8. Benacerraf, B. 1981. Cellular interactions in the role of the major histocompatibility complex in immunology. in: *The role of the major histocompatibility complex in immunobiology*, ed. M. E. Dorf, Garland Press, New York p 255.
9. Böyum, A. 1968. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 21(Suppl 97):77.
10. Centers For Disease Control. 1982. Persistent generalized lymphadenopathy among homosexual males. *MMWR* 31:249.
11. Centers For Disease Control Task. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR* 31:353.
12. Centers For Disease Control Task. 1983. Update on AIDS. *MMWR* 32:309.
13. Chen, A.R., K.P. McKinnon, and H.S. Koren. 1985. Lipopolysaccharide stimulates fresh human monocytes to lyse actinomycin D-treated Wehi-164 target cells via increased secretion of a monokine similar to tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 135:3978.

14. Chen, Y.X., R.L. Evans, M.S. Pollack, L.L. Lanier, J.H. Philips, C. Rousso, N.L. Warner, and F.M. Brodsky. 1984. Characterization and expression of the HLA-DC antigens defined by anti-Leu 10. *Human Immunol.* 10:221.
15. Colotta, F., G. Peri, A. Villa, and A. Mantovani. 1984. Rapid killing of actinomycin D treated tumor cells by human mononuclear cells. *J.Immunol.* 132:936.
16. Dagleish, A.G., P.C.L. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, and R.A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763.
17. Dimitriu-Bona, A., G.R. Burmester, S.J. Waters, and R.J. Winchester. 1983. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 130:145.
18. Elliott, J.L., W.L. Hoppes, M.S. Platt, J.G. Thomas, I.P. Patel, and A. Gansar. 1983. The acquired immunodeficiency syndrome and mycobacterium avium intracellular bacteremia in a patient with hemophilia. *Ann.Int.Med.* 98:290.
19. Epstein, L.G., L.R. Sharer, E.-S. Cho, M. Myenhofer, B.A. Navia, and R.W. Price. 1984. HTLVIII/LAV-like retrovirus particles in the brains of patients with AIDS encephalopathy. *AIDS Research* 1:447.
20. Finberg, R., and B. Benacerraf. 1981. Induction, control and consequences of virus specific cytotoxic T cells. *Immunol.Rev.* 58:157.
21. Friedman-Kien, A.E., L.J. Laubenstein, P. Rubinstein, E. Buimovici-Klein, M. Marmor, R. Stahl, I. Spigland, K.S. Kim, and J. Zolla-Pazner. 1982. Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann.Int.Med.* 96:693.
22. Gartner, S., P. Markovits, D.M. Markovits, M.H. Kaplan, R.C. Gallo, and M. Popovic. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233:215.
23. Gendelman, H.E., O. Narayan, S. Molineaux, J.E. Clements, and Z. Ghotbi. 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82:7086.
24. Goding, J.W. 1976. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J.Immunol.Methods* 13:215.
25. Göttlinger, H. G., P. Rieber, J.M. Gokel, K.J. Lohe, and G. Riethmüller. 1985. Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4⁺ monocytic cells in the tumor stroma. *Int.J.Cancer* 35:199.

26. Gonda, M.A., F. Wong-Staal, R.C. Gallo, J.E. Clements, O. Narayan, and R.V. Gilden. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227:173.
27. Gonwa, T.A., L.J. Picker, H.V. Raff, S.M. Goyert, J. Silver, and J.D. Stobo. 1983. Antigen-presenting capabilities of human monocytes correlates with their expression of HLA-DS, an Ia determinant distinct from HLA-DR. *J.Immunol.* 130:706.
28. Gottlieb, M.S., R. Schroff, H.M. Shankar, J.D. Weisman, P.T. Fan, R.A. Wolf, and A. Saxon. 1981. Pneumocystis carinii and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence for a new acquired immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* 305:1425.
29. Guyre, P.M., P.M. Morganelli, and R. Miller. 1983. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc-receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J.Immunol.* 72:393.
30. Gyorkey, F., J.L. Melnick, J.G. Sinkovics, and P. Gyorkey. 1985. Retrovirus resembling HTLV in macrophages of patients with AIDS. *Lancet* 1:106.
32. Hamilton, T.A., J.E. Weiel, and D.O. Adams. 1984. Expression of the transferrin receptor in murine peritoneal macrophages is modulated in the different stages of activation. *J.Immunol.* 132:2285.
33. Heagy, W., V.E. Kelley, T.B. Strom, K. Mayer, H.M. Shapiro, R. Mandel, and R. Finberg. 1984. Decreased expression of human class II antigens on monocytes from patients with AIDS. *J.Clin.Invest.* 74:2089.
34. Herrmann, F., S.A. Cannistra, H. Levine, and J.D. Griffin. 1983. Expression of interleukin-2 receptors and binding of interleukin-2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells. *J.Exp.Med.* 162:1111.
35. Ho, D.D., T.R. Rota, and M.S. Hirsch. 1986. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J.Clin.Invest.* 77:1712.
36. Jouvin, M.H., W. Rozenbaum, and M.D. Kazatchkine. 1986. Decreased expression of the C3b complement receptor (CR1) on erythrocytes of patients with AIDS. in: International conference on AIDS p.73.
37. Kelley, V.E., W. Fiers, and T.B. Strom. 1984. Cloned human interferon gamma, but not interferon beta or alpha, induces expression of HLA-DR determinants by fetal monocytes and myeloid leukemic cell lines. *J.Immunol.* 132:240.

38. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J.-C. Gluckman, and L. Montaigner. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retroviruses LAV. *Nature* 312:767.
39. Kleinerman, E.S., L.M. Ceccorulli, L.A. Zwelling, T. Twiley, R.B. Herberman, J. Jacob, and E.P. Gelmann. 1985. Activation of monocyte-mediated tumoricidal activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J.Clin.Oncology* 7:1005.
40. Lampson, L.A., and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol.* 125:393.
41. Lane, H.C., H. Masur, L.C. Edgar, G. Whalen, A.H. Rook, and A.S. Fauci. 1983. Abnormalities of B cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N.Engl.J.Med.* 309:453.
42. Lanier, L.L., and N.L. Warner. 1981. Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J.Immunol.Methods* 47:25.
43. Lifson, J.D., D.T. Sasaki, and E.G. Engleman. 1986. Utility of formaldehyde fixation for flow cytometry and inactivation of the AIDS associated retrovirus. *J.Immunol.Methods* 86:143.
44. Lohmeyer, J., P. Rieber, H. Feucht, J. Johnson, M. Hadam, and G. Riethmüller. 1981. A subset of human killer cells isolated and characterized by monoclonal antibodies. *Eur.J.Immunol.* 11:997.
45. Lubeck, M.D., Z. Steplewski, F. Baglia, M.H. Klein, K.H. Dorrington, and H. Koprowski. 1985. The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors. *J.Immunol.* 135:1299.
46. Masur, H., M.A. Michelis, J.B. Greene, I. Onorato, R.A. Vande Stouwe, R.S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H.W. Murray, and S. Cunningham-Rundles. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N.Engl.J.Med.* 305:1431.
47. McDougal, J.S., M.S. Kennedy, J.M. Sligh, S.P. Cort, A. Mawle, and J.K.A. Nicholson. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231:382.
48. McDougal, J.S., A. Mawle, S.P. Cort, J.K.A. Nicholson, G.D. Cross, J.A. Scheppler-Campbell, D. Hicks, and J. Sligh. 1985. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV, role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J.Immunol.* 135:3151.
49. McKinnon, K.P., A.R. Chen, S. Argov, B.C. Lane, and H.S. Koren. 1986. Cytolysis of actinomycin D-treated target cells by cell-free supernatants from human monocytes. *Immunobiology* 171:27.

50. Mildvan, D., U. Mathur, R.W. Enlow, P.L. Romain, R.J. Winchester, C. Colp, H. Singman, B.R. Adelsberg, and I. Spigland. 1982. Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann.Int.Med.* 96:700.
51. Moscicki, R.A., E.P. Amento, S.M. Krane, J.T. Kurnick, and R.B. Colvin. 1983. Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line U937, during incubation with T lymphocyte-conditioned medium: Detection of TH antigen and its presence on normal blood monocytes. *J.Immunol.* 131:743.
52. Murray, H.W., R.A. Gellene, D.M. Libby, C.D. Rothermel, and B.Y. Rubin. 1985. Activation of tissue macrophages from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and γ -interferon. *J.Immunol.* 135:2374.
53. Murray, H. W., B.Y. Rubin, H. Masur, and R.B. Roberts. 1984. Impaired production of lymphokines and immune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. *N.Engl.J.Med.* 310:883.
54. Narayan, O., and L.C. Cork. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev.Infect.Dis.* 7:89.
55. Nunez, G., and P. Stastny. 1983. Cytofluorometric analysis of major histocompatibility antigens on human monocytes using monoclonal antibodies. *Human Immunol.* 6:1.
56. Perussia, B., E.T. Dayton, R. Lazarus, V. Fanning, and G. Trinchieri. 1983. Immune interferon induces the receptor monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J.Exp.Med.* 158:1092.
57. Philip, R., and L.B. Epstein. 1986. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature* 323:86.
58. Pinching, A.J., D.J. Jeffries, M. Donaghy, P.E. Munday, T.J. McManus, O. Moshtael, J.M. Parkin, and J.R.W. Harris. 1983. Studies of cellular immunity in male homosexuals in London. *Lancet* ii,126.
59. Pitchenik, A.E., M.A. Fischl, G.M. Dickinson, D.M. Becker, A.M. Fournier, M.T. O'Connell, R.M. Colton, and T.J. Spira. 1983. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. *Ann.Int.Med.* 98:277.
60. Poli, G., B. Bottazzi, R. Acero, L. Bersani, V. Rossi, M. Introna, A. Lazzarin, M. Galli, and A. Mantovani. 1985. Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immunodeficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. *Clin.exp.Immunol.* 62:136.

61. Poon, M.-C., A. Landay, E.F. Prasthofer, and S. Stagno. 1983. Acquired immunodeficiency syndrome with *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Mycobacterium avium* intracellular infection in a previously healthy patient with classic hemophilia. *Ann.Int.Med.* 98:287.
62. Prince, H.E., D.J. Moody, B.I. Shubin, and J.L. Fahey. 1985. Defective monocyte function in acquired immune deficiency syndrome (AIDS): evidence from a monocyte-dependent T-cell proliferative system. *J.Clin.Immunol.* 5:21.
63. Rieber, E.P., G. Rank, and G. Riethmüller. 1986 Transferrin receptors on tumor and bone marrow cells: lack of involvement as target structure for natural killer cells. *Klin.Wochenschrift.* 64:136.
64. Rieber, E.P., and G. Riethmüller. 1986. Loss of circulating T4+ monocytes in patients infected with HTLV-III/LAV. *Lancet* 1,8475.
65. Rieber, P., G. Rank, S. Wirth, M. Wilhelm, E. Kopp, and G. Riethmüller. 1984. Modulation of T cell functions by monoclonal "pan T cell" antibodies not directed against the T cell receptor complex. in: *Leukocyte Typing II*, eds. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., Bernstein, I.D. p 233.
66. Rogers, M.F., D.M. Morens, J.A. Stewart, R.M. Kaminski, T.J. Spira, P.M. Feorino, S.A. Larson, D.P. Francis, M. Wilson, L. Kaufman, and Task Force On AIDS. 1983. National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* Pneumonia in homosexuals men: Part 2 laboratory results. *AnnInt.Med.* 99:151.
67. Rook, A.H., H. Masur, H.C. Lane, W. Frederick, T. Kasahara, A.M. Macher, J.Y. Djeu, J.F. Manischewitz, L. Jackson, A.S. Fauci, and G.V. Quinnan. 1983. Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *J.Clin.Invest.* 72:398.
68. Röllinghoff, M., and N.L. Warner. 1973. Specificity of in-vivo tumor rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumor cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 144:813.
69. Salahuddin, S.Z., R.M. Rose, J.E. Groopman, P.D. Markham, and R.C. Gallo. 1986. Human T lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. *Blood* 68:281.
70. Schroff, R.W., M.S. Gottlieb, M.S. Prince, L.L. Chai, and J.L. Fahey. 1983. Immunological studies of homosexual men with immunodeficiency and Kaposi's sarcoma. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 27:300.
71. Sei, Y., R.J. Petrella, P. Tsang, and J.G. Bekesi. 1986. Monocytes in AIDS. *New Engl. J.Med.* 315:1611.

72. Shaw, G.M., M.E. Harper, B.H. Hahn, L.G. Epstein, D.C. Gajdusek, T.W. Price, B.A. Navia, C.K. Petito, C.J. O'Hara, J.E. Groopman, E. Cho, J.M. Oleske, F. Wong-Staal, and R.C. Gallo. 1985. HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* 227:177.
73. Siegal, F.P., C. Lopez, G.S. Hammer, A.E. Brown, S. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S.Z. Hirschman, S. Cunningham-Rundles, and D. Armstrong. 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals manifested by chronic perianal ulcerative Herpes simplex lesions. *N.Engl.J.Med.* 308:1439.
74. Smith, P.D., K. Ohura, H. Masur, H.C. Lane, A.S. Fauci, and S.M. Wahl. 1984. Monocyte function in the acquired immune deficiency syndrome. *J.Clin.Invest.* 74:2121.
75. Sonigo, P., M. Alizon, K. Staskus, D. Klatzman, S. Cole, O. Danos, E. Retzel, P. Tiollais, A. Haase, and S. Wain-Hobson. 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42:369.
76. Sztein, M.B., P.S. Steeg, D. Mann, R. Stiehm, R.M. Blaese, and J.J. Oppenheim. 1984. Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigen expression in vitro by lymphokines and recombinant interferons. *J.Clin.Invest.* 73:556.
77. Tax, W.J.M., F.F.M. Hermes, R.W. Willems, P.J.A. Capel, and R.A.P. Koene. 1984. Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation. *J.Immunol.* 133:1185.
78. Termyijelen, A., A. Van Leeuwen, and J.J. Van Rood. 1982. HLA-linked lymphocyte activating determinants. *Immunol.Rev.* 66:79.
79. Titus, J.A., S.O. Sharrow, and D.M. Segal. 1983. Analysis of Fc (IgG) receptors on human peripheral blood leukocytes by dual fluorescence flow microfluorometry. *J.Immunol.* 130:1152.
80. Todd, R.F., III, P.A. Alvarez, D.A. Brott, and D.Y. Liu. 1985. Bacterial lipopolysaccharide, phorbol myristate acetate, and muramyl dipeptide stimulate the expression of a human monocyte surface antigen, Mo3e. *J.Immunol.* 135:3869.
81. Vieira, J., E. Frank, T.J. Spira, and S.H. Landesman. 1983. Acquired immune deficiency in Haitians: opportunistic infections in previously healthy Haitian immigrants. *N.Engl.J.Med.* 308:125.
82. Vogel, S.N., D.S. Finbloom, K.E. English, D.L. Rosenstreich, and S.G. Langreth. 1983. Interferon-induced enhancement of macrophage Fc-receptor expression: -interferon treatment of C3H/HeJ macrophages results in increased numbers and density of Fc-receptors. *J.Immunol.* 130:1210.
83. Walker, W.S., R.H.J. Beelen, P.J. Buckley, S.L. Melvin, and S.E. Yen. 1984. Some fixation reagents reduce or abolish the detectability of IaAntigen and HLADR on Cells. *J.Immunol.Methods* 17:568.

84. Watson, A.J., R. DeMars, I.S. Trowbridge, and F.H. Bach. 1983. Detection of a novel human class II HLA antigen. *Nature* 304:358.
85. Weinberg, J.B.; H.A. Chapman, and J.B. Hibbs. 1978. Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J.Immunol.* 121:72.
86. Wilhelm, M., H. Pechumer, G. Rank, E. Kopp, G. Riethmüller, and E.P. Rieber. 1986. Direct monoclonal antibody rosetting- an effective method for weak antigen detection and large scale separation of human mononuclear cells. *J.Immunol.Methods* in press.
87. Wood, G.S., N.L. Warner, and R.A. Warnke. 1983. Anti Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J.Immunol.* 131:212.
88. Wormser, G.P., L.B. Krupp, J.P. Hanrahan, G. Gavis, T.J. Spira, and S. Cunningham-Rundles. 1983. Acquired immunodeficiency syndrome in male prisoners: new insights into an emerging syndrome. *Ann.Int.Med.* 98:297.
89. Yamashita, V., and E.M. Shevach. 1977. The expression of Ia antigens on immunocompetent cells in the guinea pig II. Ia antigens on macrophages. *J.Immunol.* 119:1584.
90. Zembala, M., W. Uracz, I. Ruggiero, B. Mytar, and J. Pryjma. 1984. Isolation and functional characteristics of FcR^+ and FcR^- human monocyte subsets. *J.Immunol.* 133:1293.
91. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., A. Möller, R.P. Linke, J.G. Haas, E.P. Rieber, and G. Riethmüller. 1986. Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Research* 46:5947.
92. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., and G. Riethmüller. 1984. A rapid assay for cytotoxicity of unstimulated human monocytes. *J.N.C.I.* 72:23.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für die Überlassung des Themas, die finanzielle Unterstützung und die theoretische Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. Löms Ziegler-Heitbrock danke ich für den Arbeitsplatz in seinem Labor, die intensive Betreuung und die wertvollen Diskussionen.

Herrn Dr. Schramm (Med. Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abt. Hämostaseologie), Herrn Dr. Jäger (Allg. Krankenhaus Schwabing, Abt. Innere Medizin, München) und Frau Dr. Fröschl (Dermatologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) danke ich für die Blutproben der untersuchten Patienten.

Herrn Prof. Dr. Peter Rieber (Immunologie der LMU München), Frau Dr. Nancy Reinsmoen und Herrn Dr. Fritz Bach (beide Immunobiology Research Center, Minneapolis, USA) danke ich für die verwendeten monoklonalen Antikörper.

Frau Brigitte Weiss danke ich für die technische Unterstützung und Herrn Eugen Kopp für die wertvollen Diskussionen über die Aufreinigung von Proteinen.

Herrn Tilman Schlunk danke ich für die Durchführung der flowzytometrischen Analyse auf dem EPICS V.

LEBENS LAUF

- | | |
|--------------------------------|---|
| 20. August 1961 | geboren in Sindelfingen als Sohn des Wilhelm Haas und der Anna Haas, geborene Adamy. |
| August 1967
bis Juli 1971 | Besuch der Grundschule in Sindelfingen-Darmsheim |
| August 1971
bis Mai 1980 | Besuch des Stiftungsgymnasiums in Sindelfingen mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife |
| Juni 1980
bis Sept. 1981 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz als Rettungsanitäter |
| Oktober 1981
bis Sept. 1984 | Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| Oktober 1984
bis Okt. 1987 | Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München |

